ISSN 0022-4847

台灣農業研究

第五十七卷　　第四期

研究報告

阿里山山櫻遺傳多樣性之研究
溫英杰、張靜誼、高建元 233

銀耳多醣產品毒理及致突變性評估
楊淑惠、陳鯤兆、吳昭慧、廖俊旺 243

德國消費者對台灣椪柑消費偏好之研究
江秀娥、楊世華、潘德芳 256

台灣柑橘潰瘍病菌新菌株之特性分析
林信成、張翔、曾國欽 265

甘藷新品種台農 73 號之育成
賴永昌、李忠田、鄭統隆、蔡武雄 279

台灣銅皮石斛的種子發芽及大量繁殖
羅淑芳、郭昭麟、陳宗禮、蔡新聲 295

丹参毛狀根培養建立與其丹参酮含量之研究
陳威臣、詹効松、李秋儀、曹進義、劉禎祺、李艷琪、夏奇鋌 305

研究簡報

稻米品質功能性標誌分析
陳哲仁、曾東海、李長沛、吳明哲 317

中華民國九十七年十二月

行政院農業委員會農業試驗所出版

中華民國　台灣　台中縣　霧峰鄉

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):233–242 (2008)

阿里山山櫻遺傳多樣性之研究[1]

溫英杰[2,4] 張靜誼[2] 高建元[3]

摘　要

溫英杰、張靜誼、高建元。2008。阿里山山櫻遺傳多樣性之研究。台灣農業研究 57:233–242。

阿里山山櫻 (*Prunus transarisanesis* Hayata) 是台灣特有種櫻花，分布於本省高海拔地區，依據台灣植物誌的描述其花朵中大、粉白色、2–3 朵叢生。種原採集調查發現，阿里山山櫻的花色有白色、粉白及粉紅的變化，新葉的顏色及葉形也有不同，顯示阿里山山櫻種內的遺傳多樣性甚為豐富。利用 RAPD 技術對 1 個霧社櫻及 14 個阿里山山櫻品系進行遺傳相似度分析，由 300 條隨機引子中篩選出 13 條引子共擴增 121 條條帶，其中多態性條帶 89 條占 73.6%。群集分析結果，15 個試驗品種共分為七群，遺傳相似度係數介於 0.39–0.88 之間，武陵 2 和 3 號遺傳相似度係數為 0.88，親緣關係最近。霧社櫻與其他阿里山山櫻品系的遺傳相似度係數為 0.39，親緣關係最遠。

關鍵詞：阿里山山櫻、遺傳多樣性、逢機增殖多型性 DNA。

前　言

阿里山山櫻 (*Prunus transarisanesis* Hayata) 是台灣特有種櫻花，分布於本省高海拔地區，花朵中大、粉白色、2–3 朵叢生，小花梗較長是其特徵 (Liu *et al.* 1994)。但是種原調查發現，阿里山山櫻的花色有白色、粉白及粉紅的變化，新葉的顏色及葉形也有不同，顯示阿里山山櫻種內的遺傳多樣性極為豐富。有些櫻花花色會隨著花朵開放時間的長短而改變，葉片形狀也有可能因植株立地條件不同而異，因此這些外型上的差異，是否可做為分類上的依據，有待進一步的研究。RAPD (random amplified polymorphic DNA) 是根據 DNA 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，利用人工隨機合成的 DNA 分子作引子 (primer)，將取自組織中的基因組 DNA 為模板，經過 PCR 反應器，進行 DNA 片段的隨機合成 (Williams *et al.* 1990)。如果引子與某一片段的模板 DNA 具有互補核苷酸序列，則該引子就會結合到單鏈的 DNA 上去，因此可以對整個基因組 DNA 進行多型性分析，用以建立特定基因標誌，或提供種和品種的演化、分類及鑑定等。利用一系列引子進行 PCR

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2332 號。接受日期：97 年 9 月 24 日。
2. 本所農場管理組副研究員、研究助理。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 國立宜蘭大學園藝系助理教授。台灣 宜蘭縣 宜蘭市。
4. 通訊作者，電子郵件：icwen@wufeng.tari.gov.tw；傳真：(04)23390791。

反應，能獲得不同長度的 DNA 片段，這些 DNA 片段可作爲鑑定不同分類等級的分子性狀，根據電泳譜條帶的差異，可以計算遺傳距離或相似係數，建立譜系關係樹狀圖，用來鑑別它們的差異程度及親緣關係。

由於不同的分子標記可以在不同的類群中產生獨特的帶型，或者得到種或種以上分類等級特異性的條帶，沒有傳統分類法易受環境及季節影響的缺點，因此 DNA 分子標記用於種級分類的研究越來越多。國內利用此一技術來鑑定種原親緣關係的木本作物有桃 (Wen & Chieh 2003)、李 (Wen & Liu 2004)、梅 (Wen *et al.* 2006)、櫻花 (Wen & Chang 2005) 及桶柑 (Wong *et al.* 2003)，其它國家則有許多報導，如樹莓 (Lanham & Brennan 2001)、杏 (Wu & Chen 2003)、枇杷 (Pan *et al.* 2002)、荔枝 (Anuntalabhochai *et al.* 2002) 及阿月渾子 (Tang *et al.* 2003) 等，此說明 RAPD 技術已在許多種木本作物的親緣鑑定上得到廣泛的應用。本試驗採集不同地區阿里山山櫻 14 份，利用 RAPD 分子標誌技術分析其親緣關係，並分析外型上的差異是否足以作爲分類上之依據。

材料與方法

植物材料

試驗所用材料爲 1 份霧社櫻 (*Prunus taiwaniana* Hayata) 及 14 份阿里山山櫻，採自塔山 (alt. 2200 m)、志良 (alt. 2000 m)、武陵農場 (alt. 1800 m) 及思源啞口 (alt. 2100 m)，樹齡估計 20–30 年生，其名稱及來源詳如表 1。

種原特性調查

調查項目包括：開花日期、花朵形態、顏色、葉片形狀及新葉顏色等。調查標準如下：開花日期：全株約有 50%的花朵開花。

表 1.試驗所用櫻花品系 (種) 名稱及來源

Table 1. The original and name of 15 flowering cherry cultivars used in the assay

No.	Cultivar name	Scientific name	Locate of material
1	Wu-sheh Ying	*Prunus taiwaniana* Hayata	Wu-ling
2	Si-yuan No.1	*Prunus transarisanensis* Hayata	Si-yuan
3	Si-yuan No.2	*Prunus transarisanensis* Hayata	Si-yuan
4	Jyh-liang No.1	*Prunus transarisanensis* Hayata	Jyh-liang
5	Jyh-liang No.2	*Prunus transarisanensis* Hayata	Jyh-liang
6	Jyh-liang No.3	*Prunus transarisanensis* Hayata	Jyh-liang
7	Wu-ling No.1	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
8	Wu-ling No.2	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
9	Wu-ling No.3	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
10	Wu-ling No.4	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
11	Wu-ling No.5	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
12	Wu-ling No.6	*Prunus transarisanensis* Hayata	Wu-ling
13	Si-yuan No.3	*Prunus transarisanensis* Hayata	Si-yuan
14	Ta-san No.1	*Prunus transarisanensis* Hayata	Ta-san
15	Ta-san No.2	*Prunus transarisanensis* Hayata	Ta-san

DNA 抽取方法

從不同植株採取新鮮的嫩葉 0.1–0.2 g，利用液態氮脫水乾燥，再研磨成粉末。加入 65℃ DNA 萃取緩衝液 [100 mM Tris-HCl, pH8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl; 2% (w/v) CTAB; 1% (v/v) PEG6000; 0.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol] 600 μL，輕輕混勻後，置於 65℃水浴鍋中 30 min，取出靜置至室溫。加入 600 μL 氯仿/異戊醇 (chloroform-isoamyl alcohol 24:1, v/v)，混勻，以 9,000 rpm (MICRO 240A, Denville Scientific Inc.) 離心 10 min。取上層液至新的微量離心管中，加入 400 μL 的異丙醇 (isopropanol)，混勻，以 9,000 rmp 離心 10 min。去上清液，加入 1 mL 的洗滌緩衝液 [washing buffer 76% (v/v) ethanol; 10 mM ammonium acetate] 清洗沈澱物，9,000 rmp 離心 10 min。去上清液，沈澱物以真空乾燥之。沈澱物溶於 50 μL TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH7.4; 1 mM EDTA) 中，加入 RNaseA，使其最後濃度為 50 mg/mL，於 37℃下反應 1 h。將 DNA 稀釋 100 倍，利用光電比色計測定 OD_{260}的吸光值，計算 DNA 的濃度。

聚合酵素連鎖反應與電泳分析

以 30 ng 的 genomic DNA 當模板，在總體積 30 μL 反應溶液中進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。其溶液中另含有 10 mM Tris-HCl，pH9.0；50 mM KCl；0.1% Triton X-100；2.5 mM $MgCl_2$；200 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)；0.2 mM 引子及 0.5 unit Taq DNA polymerase (Promega)，引子採用 Operon kit (OPAA-OPAE, OPA-OPJ 共 300 條)，並在溶液上層加入 50 μL 的礦物油，置入 DNA 熱循環儀 (STRATAGENE, robocycler gradient 96 temperature cycler) 中。反應溫度條件為 94℃ 3 min→37℃ 1 min 20 s→72℃ 1 min 20 s，當第一個循環後；再以 94℃ 1 min 20 s→37℃ 1 min 20 s→72℃ 2 min 20 s，進行 44 個循環，反應完成時自動保存於 4℃恆溫槽中。

取 12 μL 經聚合酵素連鎖反應增殖的 DNA，加入 1 μL 稀釋 6 倍電泳指示液 (loading dye, 30% glycerol; 0.025% Bromophenol blue)，以 1.5%瓊脂膠體 (agarose, boehringer mannheim gmbH Germany) 進行電泳，時間約 30 min。結束後以 0.5 mg/mL 溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色 20–30 min，於 UV 燈下觀察膠體 DNA 多型性片段，照相及貯存影像于 Kodak Digital Science ID Image Analysis (Eastman Kodak Co.) 影像分析系統，進行資料比對分析。

親緣關係分析

依 Jaccard (1901) 所提之相似度計算公式計算各族群間的相似度，其公式如下：Nab/(Na + Nb − Nab)，其中 Na 是樣本 a 的條帶數，Nb 是樣本 b 的條帶數，Nab 是樣本 a 和 b 共有的條帶數。依此法將所有樣本間兩兩的相似度計算出。

並利用 NT-SYS 軟體所提供的未加權平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 來計算其放大 DNA 片段相似性及建立其親緣關係圖。

結　果

種原特性調查

試驗所用 15 份材料除了霧社櫻 (*Prunus tawaniana* Hayata) 外其餘皆為採自不同地區之阿里山山櫻。表 2 列出參試 15 種櫻花種原之開花期、花朵形態、顏色、葉片及新葉顏色等性狀。

開花期早晚與櫻花品種及採集地區海拔高度有關，霧社櫻 3 月上旬即有 50%花朵綻放，為所有參試種原中開花最早者。霧社櫻為採自武陵之單株，小花，萼筒葫蘆型為其特徵。阿里山山櫻開花期大致上隨著海拔高度而延後，只有在武陵農場採集之品系開花期顯現出差異。阿里山山櫻種原不僅在花期產生變化，花色、葉片形狀及新葉顏色也呈現多樣性。根據台灣植物誌的記載阿里山山櫻的花色為粉白或淡粉紅色 (Huang 1993)，試驗所採集到的阿里山山櫻則有白色 (武陵 2、3、5 號)、粉白 (武陵 1、6 號、志良 3 號)、粉紅 (思源 1、2、3 號、志良 1 號、武陵 4 號、塔山 1、2 號) 和同時開粉紅及白花 (志良 2 號) 的品系。葉形有橢圓及廣橢圓形之分，新葉顏色亦有紅色及綠色兩種。新葉呈綠色的品系 (志良 2 號、武陵 4 號、思源 3 號、塔山 1、2 號)，其葉形較圓呈廣橢圓形 (表 2)。

RAPD 分析

以 Operon kit OPA-OPJ、OPAA-OPAE 共 300 條逢機引子篩選試驗材料，得到 13 個引子對試驗材料之 DNA 可呈現多型性且再現性良好 (OPA 3, OPA 13, OPG 16, OPH 3, OPH 8, OPH 13, OPH 18, OPI 6, OPAA 1, OPAA 15, OPAB 3, OPAE 10, OPAE 14)。由此 13 個引子所獲得的 RAPD 產物在電泳膠片上總共產生 121 個可辨識之條帶，其中多型性條帶 89 條占 73.6%。每個逢機引子擴增的 DNA 條帶數在 4–16 條之間，條帶大小介於 240 bp 至 1,750 bp。整體而言，所篩選的逢機引子以 OPH、OPA、OPAA 及 OPAE 四組的擴增效果最好 (表 3)。以 OPAA 15 引子進行 PCR 反應結果獲得 12 條多型性片段，其中包含可供鑑別武陵 5 號阿里山山櫻的特殊片段 (470 和 650 bp) (圖 1 及表 4)。OPH 8 引子擴增結果產生 8 條多型性 DNA 片段，其中 1,400 bp 之片段為思源 3 號阿里山山櫻品種

表 2. 試驗所用櫻花種原特性

Table 2. Flower and leaf characteristics of flowering cherry used in this study

Cultivar name	Flowering date [z]	Flower type	Flower color	Leaf shape	Young leaf color
Wu-sheh Ying	early March	single	white	elliptical	green
Si-yuan No.1	early April	single	pink	elliptical	red
Si-yuan No.2	early April	single	pink	elliptical	red
Jyh-liang No.1	late March	single	pink	elliptical	red
Jyh-liang No.2	late March	single	pink and white	broad elliptical	green
Jyh-liang No.3	late March	single	whitish pink	elliptical	red
Wu-ling No.1	early April	single	whitish pink	elliptical	red
Wu-ling No.2	early April	single	white	elliptical	red
Wu-ling No.3	late March	single	white	elliptical	red
Wu-ling No.4	early April	single	pink	broad elliptical	green
Wu-ling No.5	late March	single	white	elliptical	red
Wu-ling No.6	late March	single	whitish pink	elliptical	red
Si-yuan No.3	early April	single	pink	broad elliptical	green
Ta-san No.1	mid. April	single	pink	broad elliptical	green
Ta-san No.2	mid. April	single	pink	broad elliptical	green

[z] 50% of the flower bloosm.

表 3. 13 個 RAPD 引子在櫻花品系（種）上擴增結果

Table 3. Observed polymorphism with 13 primers used for RAPD analysis in 15 flowering cherry cultivars

Primer code	Primer Sequence 5'→3'	No. of polymorphism bands	No. of amplified bands	Band size (bp) Min.	Max.
OPA 3	AGTCAGCCAC	9	9	380	980
OPA 13	CAGCACCCAC	10	13	280	1400
OPG 16	AGCGTCCTCC	7	10	350	1250
OPH 3	AGACGTCCAC	8	11	430	1600
OPH 8	GAAACACCCC	5	8	490	1400
OPH 13	GACGCCACAC	2	4	650	850
OPH 18	GAATCGGCCA	5	7	560	1750
OPI 6	AAGGCGGCAG	7	8	450	800
OPAA 1	AGACGGCTCC	7	10	310	1450
OPAA 15	ACGGAAGCCC	7	12	310	1250
OPAB 3	TGGCGCACAC	4	6	240	1350
OPAE 10	CTGAAGCGCA	4	7	310	1000
OPAE 14	GAGAGGCTCC	14	16	410	1750
TOTAL		89	121		

表 4. 櫻花品系（種）之特定 RAPD 片段

Table 4. Specific RAPD fragments of flowering cherry cultivars

Cultivars	Primer revealing specific fragments (base pair)
Wu-sheh Ying	G16 (700)
Wu-ling No.4	AE10 (310)
Wu-ling No.5	H3 (820), I6 (1750), AA (650), AA (470)
Si-yuan No.3	H3 (800), H8 (1400), H18 (1380)
Ta-san No.1	H13 (500)

標誌之特定條帶（圖 2 及表 4），總計 13 條逢機引子擴增結果共獲得 OPG 16 (700), OPAE 10 (310), OPH 3 (820), OPI 6 (1750), OPAA 15 (650), OPAA 15 (470), OPH 3 (800), OPH 8 (1400), OPH 18 (1380), OPH 13 (500) 等 10 條多型性 DNA 片段，作爲霧社櫻、武陵 4 號、武陵 5 號、思源 3 號及塔山 1 號等 5 個櫻花品種（系）的鑑別標誌。

親緣關係分析

將篩選得到的 13 條逢機引子其 RAPD 產物產生之 121 個可辨識之條帶，進行未加權平均法群集分析，並以 Jaccard's 相似度係數分析，來估算試驗品種間之遺傳相似度係數。再以相似度係數矩陣（similarity coefficient matrix) (表 5) 繪製相似度樹狀圖（dendrogram)，相似度係數越高代表親緣關係越近。分析結果 15 個櫻花種原可分爲七群：第一群爲霧社櫻，與二至七群的阿里山山櫻之遺傳相似度爲 0.39，親緣關係最遠。第二群爲思源 1、2 號、志良 1、3 號和武陵 1、6 號等六個阿里山山櫻品系，其中開粉紅色花的思源 1 和 2 號、志良 1 號成一亞群，開粉白色花的武陵 1 和 6

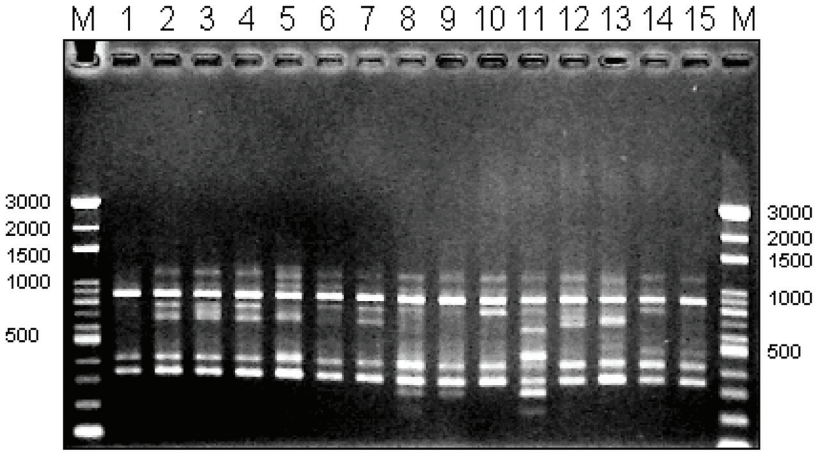

圖 1. 以 OPAA 15 爲引子之 15 個櫻花品種 RAPD 圖譜。 (1–15 爲櫻花品種代號，詳見表 1。)

Fig. 1. RAPD patterns of 15 flowering cherry cultivars obtained with primers OPAA 15. Line numbers at top refer to the number in Table1. M = molecular weight marker.

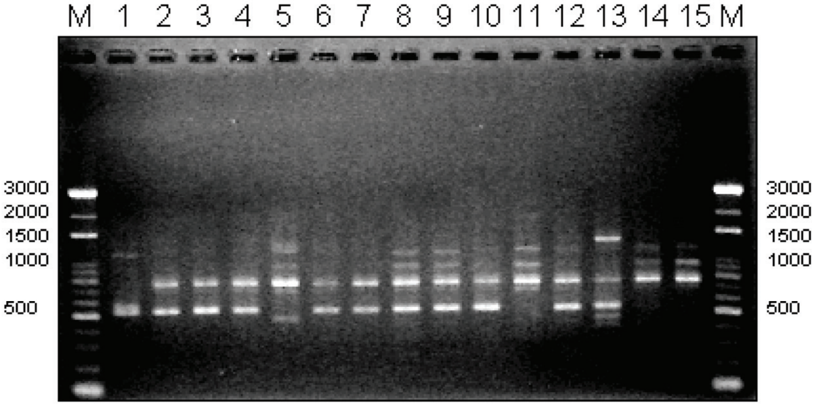

圖 2. 以 OPH 8 爲引子之 15 個櫻花品種 RAPD 圖譜。 (1–15 爲櫻花品種代號，詳見表 1。)

Fig. 2. RAPD patterns of 15 flowering cherry cultivars obtained with primers OPH 8. Line numbers at top refer to the number in Table1. M = molecular weight marker.

號及志良 3 號則各自成一亞群。第三群包括 3 個開白花的阿里山山櫻品系—武陵 2、3 及 5 號。第二、三群之阿里山山櫻品系新葉顏色皆爲紅色。武陵 4 號、志良 2 號、思源 3 號各自成一群，分別爲四、五、六群，塔山 1 號及 2 號則構成第七群。第四至七群之阿里山山櫻品系新葉顏色爲綠色，葉形較圓，花朵顏色除了志良 2 號同時開白花及粉紅花外，其餘皆開粉紅色花 (圖 3)。在所分析的 15 個品種中，遺傳相似度係數介於 0.39–0.88 之間，武陵 2 和 3 號遺傳相似度係數爲 0.88，親緣關係最近。霧社櫻與其他阿里山山櫻品系的遺傳相似度係數爲 0.39，親緣關係最遠。

表 5. 15 個櫻花品系 (種) 間的 RAPD 標誌相似性係數矩陣

Table 5. Matrix of similarity coefficients of RAPD markers among 15 cultivars of flowering cherries

	Wu-sheh Ying	Si-yuan No.1	Si-yuan No.2	Jyh-liang No.1	Jyh-liang No.2	Jyh-liang No.3	Wu-ling No.1	Wu-ling No.2	Wu-ling No.3	Wu-ling No.4	Wu-ling No.5	Wu-ling No.6	Si-yuan No.3	Ta-san No.1	Ta-san No.2
Wu-sheh Ying	1.0000														
Si-yuan No.1	0.3529	1.0000													
Si-yuan No.2	0.3276	0.7200	1.0000												
Jyh-liang No.1	0.3091	0.8000	0.7451	1.0000											
Jyh-liang No.2	0.3818	0.5741	0.4762	0.6000	1.0000										
Jyh-liang No.3	0.3400	0.4902	0.5849	0.5800	0.4068	1.0000									
Wu-ling No.1	0.3333	0.6042	0.6346	0.6327	0.4000	0.5957	1.0000								
Wu-ling No.2	0.2951	0.5714	0.5738	0.5690	0.4179	0.5357	0.5818	1.0000							
Wu-ling No.3	0.3051	0.5357	0.5410	0.5345	0.4091	0.5000	0.5455	0.8824	1.0000						
Wu-ling No.4	0.3051	0.4576	0.5161	0.5085	0.3881	0.5273	0.5179	0.4769	0.4921	1.0000					
Wu-ling No.5	0.2432	0.4028	0.5352	0.4857	0.3846	0.4776	0.4493	0.5634	0.5352	0.5139	1.0000				
Wu-ling No.6	0.2586	0.5769	0.5789	0.6346	0.4355	0.4815	0.5283	0.5333	0.5000	0.4754	0.4789	1.0000			
Si-yuan No.3	0.2969	0.4154	0.4925	0.4179	0.3750	0.4286	0.4000	0.3784	0.3514	0.3889	0.3690	0.4328	1.0000		
Ta-san No.1	0.3673	0.4615	0.5000	0.4364	0.3833	0.4510	0.4423	0.3871	0.3770	0.3333	0.3378	0.3793	0.4063	1.0000	
Ta-san No.2	0.3913	0.4038	0.3966	0.3818	0.3559	0.3922	0.3846	0.3387	0.3500	0.3065	0.2973	0.3276	0.3594	0.7750	1.0000

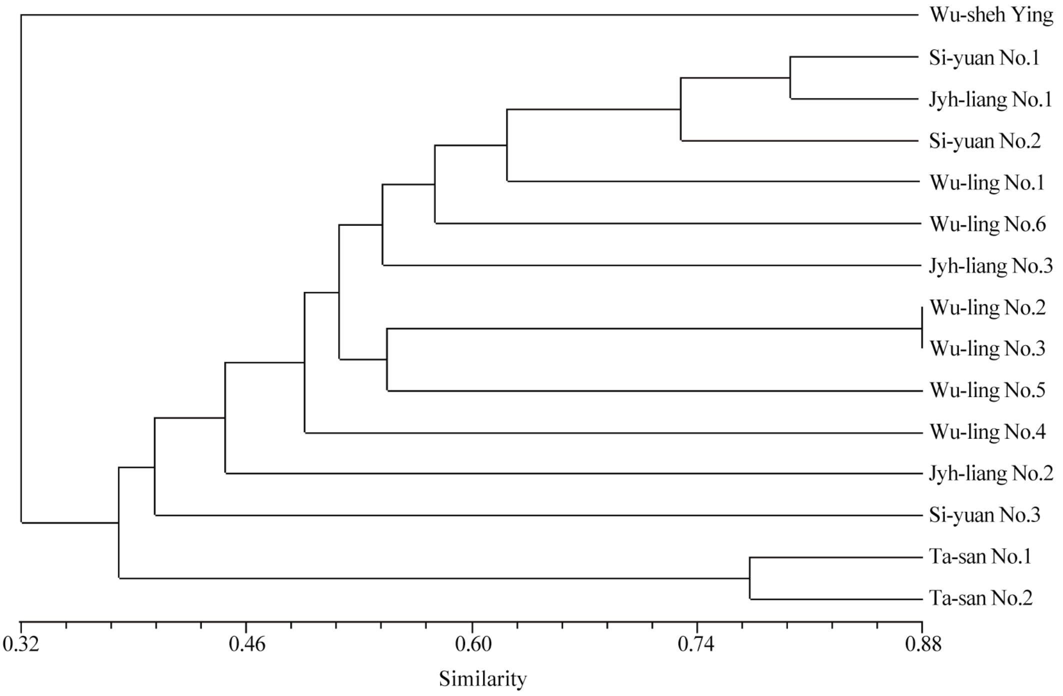

圖 3. 15 個櫻花品種之 RAPD 遺傳相似度聚類分析樹狀圖。

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 15 flowering cherry varieties, constructed by Jaccard's distance and UPGMA clustering method from 121 RAPD markers.

討　　論

本試驗首次探討不同地區阿里山山櫻之親緣關係，由聚落分析圖得知，14 個阿里山山櫻遺傳相似度係數介於 0.41–0.88 之間。利用同一技術分析台灣山櫻及霧社櫻，其遺傳相似度係數分別介於 0.65–0.77 及 0.73–0.85 (Wen & Chang 2005)。利用 RAPD 分析本省桃、李種原之親緣關係，參試 30 個桃種原其遺傳相似度係數介於 0.73–0.93 (Wen & Chieh 2003)，所分析的 30 個李種原遺傳相似度係數則介於 0.32–0.94 之間 (Wen & Liu 2004)，可見阿里山山櫻種內的遺傳歧異度較桃、李種原、台灣山櫻及霧社櫻高。

新葉紅色 (第二和第三群) 與綠色 (第四至七群) 的阿里山山櫻有明顯的區隔，新葉綠色的武陵 4 號與新葉紅色 (第二和第三群) 的品系親緣最近，但其遺傳相似度係數僅 0.52。新葉顏色與葉片性狀相關，新葉呈綠色的品系，其葉形較圓呈廣橢圓形 (表 2)。葉片形狀與新葉顏色同爲日本對櫻花品種分類的一個重要性狀 (Kawasaki 1984)，本試驗結果顯示，在參試的 14 個阿里山山櫻種原，依據新葉顏色的不同，應可分爲兩個以上不同的新種或品種。新葉紅色 (第二和第三群) 的阿里山山櫻品系聚落分析結果顯示，同一花色種原各自成一亞群，開粉白色花者介於開粉紅色花及白色花品系之間，推測開粉白色花之阿里山山櫻品系，可能爲開粉紅色花及開白色花品系之自然雜交後代。

根據文獻記載台灣原生櫻花除了台灣山櫻 (*Prunus campanulata* Maxim)、霧社櫻、阿里山山櫻外，尙有太平山櫻花 (*Prunus matuurai* Sasaki) 及山白櫻 (*Prunus takasagomontana* Sasaki) 等開白花的櫻花品種 (Huang 1993)，最近對於台灣櫻花分類的研究，趨向於將太平山櫻花及山白櫻合併在阿里山山櫻內 (Lin 2006)。聚落分析結果顯示，開白花之阿里山山櫻品系自成一亞群 (第 3 群)，與開粉紅色花及粉白色花之品系所組成之亞群 (第 2 群) 之遺傳相似度係數僅 0.5，應有單獨成一個新品種的空間。由塔山採集之品系與其他阿里山山櫻品系之遺傳相似度係數僅 0.39，是否爲一個新種，尙待進一步對其植株性狀作更詳細之調查與研究。

引用文獻 (Literature cited)

Anuntalabhochai, S., R. Chundet, J. Chiangda, and P. Apavatjrut. 2002. Genetic diversity within lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. Acta Hortic. 575:253–260.

Huang, T. C. 1993. Flora of Taiwan. Vol. III. 2nd ed. National Taiwan Univ. Taipei. 1084 pp.

Jaccard, P. 1901. Study of comparative distribution of flower in the porition of Alpes and Jura. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37:547–549.

Kawasaki, T. 1984. Classification of Japanese cherry trees. p.19–20. *in*: Manual of Japanese Flowering Cherry. (Honda, M. ed.) Comp. Flower Association of Japan. Tokyo. (in Japanese)

Lanham, P. G. and R. M. Brennan. 2001. Genetic diversity in *Ribus*. Acta Hortic. 546:135–144.

Lin, T. H. 2006. Taxonomics Studies on the Prunoideae (Rosaceae) in Taiwan. Master thesis. National Chia-yi Univ. Chia-yi, Taiwan. 121 pp. (in Chinese with English abstract)

Liu, Y. C., F. Y. Lu, and C. H. Ou. 1994. Trees of Taiwan. National Chung-Hsing Univ. Taichung. 925 pp. (in Chinese).

Pan, X. F., X. G. Meng, G. L. Cao, and C. M. Xu. 2002. Application of RAPD-PCR technique for identification of varieties in loquat. J. Fruit Sci. 19:136–138. (in Chinese with English abstract)

Tang, D. M., S. P. Luo, J. Li, and H. T. Han. 2003. Sex identification of pistachio by using RAPD analysis. J. Fruit Sci. 20:124–126. (in Chinese with English abstract)

Wen, I. C. and T. C. Chieh. 2003. Genetic relationship analysis on peach germplasm by RAPD. J. Agric. Res. China. 52:143–151. (in Chinese with English abstract)

Wen, I. C. and Y. L. Liu. 2004. Evaluation and genetic relationship analysis by RAPD on oriental plum germplasm. J. Agric. Res. China. 53:97–110. (in Chinese with English abstract)

Wen, I. C. and C. Y. Chang. 2005. Evaluation and genetic relationship analysis using RAPD on flowering cherry germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 54:245–256. (in Chinese with English abstract)

Wen, I. C., C. Y. Chang, and W. T. Shaw. 2006. Evaluation and genetic relationship analysis using RAPD on *Prunus mume* Sieb. et Zucc germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 55:250–262. (in Chinese with English abstract)

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531–6535.

Wong, L. C., W. J. Yang, L. S. Chang, and T. S. Lin. 2003. The analysis of genetic variation among Tankan accessions. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 49:19–32. (in Chinese with English abstract)

Wu, S. J. and X. S. Chen. 2003. RAPD analysis of apricot cultivars. J. Fruit Sci. 20:107–111. (in Chinese with English abstract)

Study on the Genetic Diversity of *Prunus transarisanensis* Hayata[1]

Ien-Chie Wen[2,4], Ching-Yi Chang[2], and Chien-Yuan Kao[3]

Abstract

Wen, I. C., C. Y. Chang, and C. Y. Kao. 2008. Study on the genetic diversity of *Prunus transarisanensis* Hayata. J. Taiwan Agric. Res. 57:233–242.

Alishan flowering cherry (*Prunus transarisanensis* Hayata) is an endemic flowering cherry species of Taiwan. In Flora of Taiwan, Alishan flowering cherry only the whitish or light pink flowers had been recorded. In this study, we collected Alishan flowering cherry with white, whitish pink, and pink flowers. The color of new leaf and leaf shape also showed difference. It demonstrated that Alishan flowering cherry had broadly genetic diversity. The genetic relationships of 15 flowering cherry cultivars were analyzed by using RAPD markers. A total of 300 primers were screened for their ability to produce strongly amplified products. Out of 13 primers amplified 121 DNA bands, 89 of which were polymorphic (73.6%). A dendrogram based on the UPGMA cluster analysis was constructed. All tested flowering cherry cultivars were divided into seven groups, including 3 groups of Alishan flowering cherry cultivars and 4 individual cultivars. Wu-ling No.2 and Wu-ling No.3 had 88% similarity indexes, indicating the closest genetic relationship. Nevertheless, Wu-sheh Ying (*Prunus taiwaniana* Hayata) having 39% similarity indexes showed the farest genetic relationship with other tested Alishan flowering cherry cultivars.

Key words: *Prunus transarisanensis*, Genetic diversity, RAPD.

---

1. Contribution No.2332 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: September 24, 2008.
2. Associate Researcher and Research Assistant, Farm Management Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Assiatant Profeesor, Department of Horticulture, National Ilan University, Ilan, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: icwen@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23390791.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):243–255 (2008)

銀耳多醣產品毒理及致突變性評估 [1]

楊淑惠[2,5] 陳鯤兆[3] 吳昭慧[3] 廖俊旺[4]

摘　要

楊淑惠、陳鯤兆、吳昭慧、廖俊旺。2008。銀耳多醣產品毒理及致突變性評估。台灣農業研究 57:243–255。

古籍記載，銀耳性味甘、平具有滋陰潤肺、養胃生津之功效。我們的研究顯示，從銀耳子實體萃取而得之銀耳多醣，可以有效改善便秘症狀，爲確保長期大量食用銀耳多醣的安全性，進而執行本次安全性實驗。安全性試驗乃依據衛生署食品安全性評估規範。首先進行銀耳多醣對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性試驗，依體重經口單次餵食大鼠最高測試劑量 5 g/kg 體重，之後連續觀察 14 天。分析血液學、白血球分類及體內重要臟器變化結果顯示，全部供試大鼠均無中毒症狀或死亡，且均無出現與試驗物質有關之肉眼及組織病理變化，顯示銀耳多醣體對大鼠之口服急毒性 LD_{50} 值爲大於 5 g/kg 體重。銀耳多醣並進行 Ames 試驗，對五株組胺酸缺乏之沙門氏菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 進行回復突變之致變異性實驗。試驗顯示銀耳多醣不論未經或經 S9 作用後與各菌株共同培養，各濃度銀耳多醣的細菌回復突變菌數與陰性對照組相比均無顯著差異，顯示銀耳多醣體對供試沙門菌株並不具有致變異性，對細菌基因回復突變測試爲陰性反應。顯示銀耳多醣爲一安全性的物質。

關鍵詞：銀耳、多醣、大鼠、口服急毒性、沙門菌株、Ames 試驗。

前　言

銀耳 (*Tremella fuciformis* Berk)，俗稱白木耳 (white jelly fungi)，屬真菌中擔子菌 (basidiomycetes)，銀耳科 (Tremellaceae)；可食用部份爲子實體。古籍記載，銀耳性味甘、平具有滋陰潤肺、養胃生津之功效，自古被視爲能延年益壽的藥膳珍品。其活性成分銀耳多醣的化學結構爲 α-1,3-甘露聚醣 (mannan)，屬於酸性異質多醣 (acidic heteropolysaccharide) (Kakuta 1979; Yui 1995; Baets 2001)。研究證實，銀耳多醣具有降低小鼠血中之血糖 (Kiho *et al*. 1994) 與低密度膽固

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2333 號。接受日期：97 年 10 月 23 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄縣。
3. 中興大學動物疾病診斷中心助理。台灣 台中市。
4. 中興大學獸醫病理生物學研究所副教授。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：debbie@fthes-tari.gov.tw；傳真：(07)7315590。

醇含量 (Cheung 1996) 之功能。另外，並具有抗發炎 (Ukai *et al.* 1983)、促進淋巴球增生與血小板細胞活性及增加脾臟巨噬細胞的活性 (Ma & Lin 1992)，及誘導人體產生致腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) (Gao 1997, 1996; Ukai *et al.* 1992)，能提升人體免疫力 (Xia & Lin 1989) 等功能。

我們的研究顯示，從銀耳子實體萃取而得銀耳多醣溶液，在 10–80℃之溫度範圍中具有相當好之黏稠性，在 pH 3–10 之酸鹼值範圍中亦相當穩定且無明顯的稀化 (thining) 現象。將 1 g 的銀耳多醣粉末，以 200 mL 之液體進行復水，復水之多醣溶液經離心機以 10,000 rpm 離心，無離水現象，展現了良好的保水力。有便秘之苦的自願者試用顯示，每日攝食 2–5 g 的多醣粉末 (溶於 300 mL 之液體後食用)，自願者可每日正常排便，有效改善便秘症狀 (新用途專利申請中)。惟自願者在停止食用銀耳多醣的第二至三天，其排便情形會回到未攝食前的便秘狀態，意即便秘患者需每日食用適量銀耳多醣才能持續順利排便。爲確保長期大量食用銀耳多醣的安全性，而進行本次實驗。

材料與方法

銀耳多醣萃取

銀耳子實體乾品原料，復水後以熱萃取方式進行萃取，經離心、過濾，收集萃取液爲粗銀耳多醣，再經烘乾，打粉，於室溫貯存備用。供試驗用銀耳多醣爲黃白色乾燥粉末，水份含量 13%，灰分含量 0.4%，總醣量 93% (Phenol sulfuric acid method)，微量蛋白含量 0.69% (Lowry's method)，分子量大於 2×10^6 Dalton (GPC method)，其單糖組成以甘露糖 (mannose) 爲主，包括木糖 (xylose), 葡萄糖 (glucose) 及少量葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) (Baets & Vandamme 2001)。

銀耳多醣體對大鼠之口服急毒性試驗

供試動物：(1) 4 週齡大鼠 (SD 品系) 購自樂斯科生技園區實驗動物培育及研發中心 (宜蘭，台灣)，動物房溫度爲 20–22℃及 12 h 光/12 h 暗之光照週期。(2) 以鼠專用粒狀飼料 (LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA) 爲正常飼料及逆滲透水供應，經 1 週適應期後進行試驗。(3) 實驗動物之使用與操作均依據中華實驗動物學會之「實驗動物管理與使用指南」規範進行 (Yu *et al.* 2005)。

試驗步驟：(1) 口服急毒性試驗分爲 5 g/kg body weight 劑量組及對照組，每組 10 隻大鼠 (雌雄各半)，編號以飽和苦味酸染劑於背部作標識，試驗時以 Polyethylene glycerol 配置銀耳多醣，配置試驗濃度皆爲 0.5 g/mL。(2) 以不鏽鋼胃管，依體重經口餵食投予體積量爲 10 mL/kg，處理後每日觀察並每週稱體重 1 次，至處理後第 14 天止。(3) 試驗結束時，大鼠以氣體麻醉 (2% Isoflurane, Halocarbon Laboratories, South Carolina, USA) 後經腹主動脈採血，並達完全放血後犧牲，進行大體解剖，檢查體內臟器之肉眼及組織病理變化。

血液學檢查：(1) 大鼠以 Isoflurane 麻醉，自腹主動脈採集全血放入含 EDTA 抗凝血劑試管 (K3 EDTA syringes, Vacutainer, NJ, USA)，於血球計數儀 (Sysmex K-4500, Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan) 檢測血液相 (complete blood count, CBC)。(2) 紅血球數 (red blood cell count, RBC count)、血紅素 (hemoglobin, Hb)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet) 等項目。白血球分類

(differential leukocyte count) 以血液抹片，經 Weigert's Iron Hematoxylin Stain Kit (A. J. P. Scientific Inc., NJ., USA) 染色後，於光學顯微鏡 400 倍下，計算白血球中，淋巴球、嗜中性球、單核球、嗜酸性球及嗜鹼性球等百分率 (%) 等。

血清生化檢查：大鼠以 2% Isoflurane 麻醉，自腹主動脈採集全血放入含 EDTA 全血於離心機 (Kubota 2010, Tokyo, Japan)，以 3000 rpm 離心 15 min，取上清液血漿 (plasma)，以血清生化儀 (Chiron Diagnostics Corporation, Oberlin, OH, USA) 檢測肝腎血清酵素值，包括天門冬酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、氨基丙酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌胺酸 (creatinine) 等項目。

臟器病理檢查：(1) 秤大鼠腦、心、肝、腎、脾、胸腺、腎上腺，睪丸及卵巢等臟器重量 (g) 並以最後一週之最終體重 (g)，作爲體內臟器重量比率 (%) 之計算基準。(2) 觀察肉眼病理變化，取臟器浸泡於 10%中性福馬林溶液中固定 1 週，經組織粗修與石臘包埋，以石臘組織切片機 (Leica RM 2145, Nussloch, Germany) 製成 2 µm 厚度之組織切片，經 Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色後，於光學顯微鏡觀察組織病理變化。依據 Shackelford 等人 (2002) 方法進行組織病理變化描述及病理評估，標準爲 4 等級：1 = minimal (< 1%)；2 = slight (1–25%)；3 = moderate (26–50%)；4 = moderate/severe (51–75%)；5 = severe/high (76–100%)。

銀耳多醣體對沙門菌回復突變之 Ames 試驗

樣品配製：將銀耳多醣體以 10、20、30、40 及 50 mg/mL 濃度溶於 DMSO，收取上清液測定溶解度曲線。結果銀耳多醣體在 30 mg/mL 呈現最高溶解度。因此配置 30 mg/mL 銀耳多醣體溶液爲最高試驗濃度，收取其上清液經 0.45 µm 濾膜濾過爲儲存濃度。

供試菌株：本實驗所使用之 *Salmonella typhimurium* TA98，TA100 組胺酸 (histidine) 需求型變異株 (His-) 菌株購自新竹食品工業研究所 (Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu) 生物資源保存及研究中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC)。*Salmonella typhimurium* 之 TA102、TA1535、TA1537 購自 Discovery Partners International (DPI, California, USA)。試驗前均進行菌株基因型確認試驗。

培養基配製：(1) 液體營養培養基 (Nutrient broth, NB)，以 Difico® bacto nutrient broth (BD, USA) 及添加 0.5% NaCl 配製，高壓滅菌，室溫凝固，放入 4℃保存備用。(2) 固體全營養培養基 (Nutrient agar plate, NA)，以 Difico® Agar (BD, USA) 溶於 NB 營養液，高壓滅菌，於 45℃時分裝至培養皿，待凝固後放入 4℃保存備用。(3) 50× Volgel-Bonner Salts 儲存液，依序加入 10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、100 g Citric acid、monohydrate、500 g K_2HPO_4 及 175 g $NaHNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$，定量至 1,000 mL，高壓滅菌，冷凝後放入 4℃保存備用。(4) 固體最低營養需求培養基 (Minimal glucose agar plate, MA)，取 15 g Agar 加入 930 mL 逆滲透水，經高壓滅菌後，待溶液降溫至 50℃，加入 20 mL 無菌 50× VB salt、50 mL 無菌 40%葡萄糖及 3.15 mL 無菌 Ampicillin，混合均勻後分裝至培養皿，冷凝後放入 4℃保存備用。(5) 軟性瓊脂培養基 (Soft agar or Top agar)，以 0.75% Agar 與 0.5% NaCl 混合均勻，分裝倒入試管，經高壓滅菌，冷凝後放入 4℃保存。使用前再加熱溶解。

細菌毒性測試：(1) 銀耳多醣最高濃度 3 mg/plate，以逆滲透水配製 3 個測試樣品操作濃度 (working solution) 爲 1.2、6 及 30 mg/mL。(2) 取於 37℃震盪培養箱培養 18 h 後之菌液，以無菌 PBS 緩衝液連續 10 倍稀釋成 10^{-6} 倍及 10^{-7} 倍。(3) 取 100 µL 各濃度測試樣品及菌液 100 µL，加入

2 mL soft agar，vortex 震盪均勻後，置於 NA plate 上，多向性搖晃至 soft agar 平鋪。銀耳多醣體最高濃度 3 mg/plate，以逆滲透水配製 3 個測試樣品操作濃度 (working solution) 為 0.12、0.6 及 3 mg/mL。對照組最終濃度含 1% DMSO。(4) Soft agar 凝固後，將 NA 培養皿倒置於 37℃震盪培養箱，經隔夜培養後取出計算菌落及記錄。若選取之三個測試濃度具有毒性，則再向下稀釋樣品濃度，求取最高無細菌毒性之濃度。

肝臟活化酵素之製備：(1) S9 混合液 (Lot#1452, Aroclor 1254-induced rat liver, Moltox^{TM}, USA) 由森淼大自然科技有限公司購入，該產品 S9 蛋白質含量為 36.5 mg/mL。(2) 試驗前新鮮配製 S9 混合液與測試藥劑反應，每毫升 S9 混合液內含 100 μL S9 肝臟酵素抽出液、4 μmole nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (sodium salt)、5 μmole glucose-6-phosphate (mono sodium salt)、8 μmole $MgCl_2$、33 μmole KCl 及 100 μmole sodium phosphate buffer (pH 7.4)。

致變異性測試：陽性藥劑對照組：不加肝臟活化酵素直接處理試驗菌株之陽性對照組為 TA98：2.5 μg/plate 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) (Sigma-Aldrich Co., USA)；TA100：5 μg/plate Sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA)；TA102：0.5 μg/plate Mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich Co., USA)；TA1535：5 μg/plate Sodium azide (SA) (Sigma-Aldrich Co., USA)；TA1537：50 μg/plate 9-aminoacridine (9-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA)；經 S9 活化代謝之陽性對照組所有菌株皆為 5 μg/plate 2-aminoanthracene (2-AA) (Sigma-Aldrich Co., USA)。(2) 藥劑劑量：取最高無毒性濃度為最高測試濃度，並向下連續兩倍稀釋取 4 個濃度，銀耳多醣體對照組為無菌 DMSO。取 100 μL 之銀耳多醣體加入 0.2 mL 之 0.5 mM histidine (Merck, kGaA, Germany) 與 0.5 mM biotin (Sigma-Aldrich Co., USA) 混合液及 100 μL 菌液，加肝臟活化酵素處理者，另加 200 μL S9 混合液，再混入 45℃之 2 mL 0.75 % 軟性瓊脂內含 0.5 % NaCl，混合後倒入 MA 培養皿待室溫凝固後，倒置於 37℃培養箱中培養 48 h。計算培養皿之回復突變菌落數，各劑量組為 3 個重覆數。

統計分析：(1) 試驗期間各組之體重變化，依體重 (g) 或增重 (g 或%) 變化，以統計分析軟體 Microsoft Excel 進行 pair Student's t-test，或以單向變方分析法 (One-way ANOVA) 之 Duncan's test 分析進行組間比較分析，其組間之顯著差異水準為 $p < 0.05$。(2) Ames test 結果判讀，分析各劑量組與細菌回復突變數增加之相關性 (dose-response relationship)。不論測試樣品是否經肝臟酵素 (S9) 活化處理，有 2 個以上劑量組之細菌回復突變數，高於無藥劑對照組 2 倍以上者，以及各劑量組與回復突變數有顯著之線性相關者，可判定該供試樣品之致變異性結果為陽性反應。

結　　果

銀耳多醣對大鼠之口服急毒性

依據衛生署健康食品安全性評估規範進行對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性試驗。試驗時銀耳多醣以去離子水配製成溶液濃度 0.5 g/mL。每隻大鼠灌食體積量為 10 mL/kg body weight，當日依體重經口強迫灌食大鼠 1 次，最終投予劑量總計為 5 g/kg body weight，投予後連續觀察 14 天。結果顯示，以銀耳多醣口服投予大鼠後，全部鼠隻無中毒症狀或死亡，顯示測試樣品對大鼠之口服急毒性 LD_{50} 值皆大於 5 g/kg body weight。銀耳多醣處理組雄、雌鼠第 0、7 及 14 天時體重及增重亦無顯著影響 ($p > 0.05$)。

試驗結束後，檢查血液值 (complete blood count, CBC) 變化，白血球總數 (WBC count)、紅血球總數 (RBC count)、血紅素 (Hb)、血球容積比 (Hct)、平均紅血球體積 (MCV)、平均血紅素 (MCH) 及平均血紅素濃度 (MCHC) 及白血球分類等均無明顯差異 (表 1)。而在白血球分類方面，銀耳多醣處理組雄鼠之淋巴球比例和單核球比例 (85.2 ± 1.2%及 4.4 ± 1.6%) 與對照組相比爲高 (78.8 ± 4.4%及 7.4 ± 1.4%) 相比較高。但淋巴球與單核球在正常大鼠比例分別爲 70–90% 以及 0–10% (Zeng 1994)，因此在臨床上並無明顯病理意義 (表 2)。

表 1. 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠血液學變化

Table 1. Changes in hematological parameters of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test [z]

Dose (g/kg)	WBC [y] ($10^3/\mu L$)	RBC ($10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($10^3/\mu L$)
Male								
Control	9.7 ± 4.5*,x	5.7 ± 2.2	15.3 ± 0.4	35.0 ± 12.8	61.5 ± 1.9	39.0 ± 33.2	62.1 ± 50.4	882.4 ± 317.1
5	9.1 ± 3.5	8.1 ± 1.6	17.9 ± 2.6	50.0 ± 8.6	61.7 ± 2.6	22.3 ± 1.7	36.1 ± 3.1	732.0 ± 153.4
Female								
Control	12.4 ± 6.5	8.2 ± 1.7	18.4 ± 3.4	48.9 ± 10.0	59.8 ± 2.0	22.5 ± 0.5	37.7 ± 1.1	1014.8 ± 208.6
5	14.3 ± 2.0	7.9 ± 0.8	19.5 ± 2.2	49.4 ± 4.1	62.6 ± 2.2	24.7 ± 1.2	39.5 ± 1.7	1015.6 ± 156.5

[z] Blood samples were removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides.
[y] WBC: white blood count; RBC: red blood cell; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelets.
[x] Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).
* Significant difference between the control and treated groups at $p < 0.05$.

表 2. 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠白血球分類變化

Table 2. Changes in white blood cells of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test [z]

Dose (g/kg)	WBC ($10^3/\mu L$)	Lymph (%)	Neutrophil (%)		Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
			Band	Segment			
Male							
Control	9.7 ± 4.5 [y]	78.8 ± 4.4	0.4 ± 0.8	13.2 ± 4.9	7.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
5	9.1 ± 3.5	89.0 ± 3.5*, x	0.0 ± 0.0	6.8 ± 1.7*	4.4 ± 1.6*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Female							
Control	12.4 ± 6.5	77.2 ± 8.8	0.0 ± 0.0	13.4 ± 7.7	5.4 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	14.3 ± 2.0	84.8 ± 4.8	0.4 ± 0.8	9.0 ± 3.9	5.8 ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[z] Blood samples were removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides.
[y] Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).
x,* Significant difference between the control and treated groups at $p < 0.05$.

在肝腎血清酵素值方面，銀耳多醣處理組雌鼠之天門冬酸轉胺酶 (AST) (94.6 ± 14.0 mg/dL) 較對照組雌鼠 (154.6 ± 21.5 mg/dL) 低 ($p < 0.05$)，但仍位於正常值 80.86–194.14 mg/dL 範圍內，在臨床上並無明顯病理意義 (Charles River laboratories, 2005)。而氨基丙酸轉胺酶 (ALT)、及肌胺酸 (creatinine) 及尿素氮 (BUN) 值等項目均無與試驗物質有關之影響 (表 3)。

體內臟器重量包括腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢重量及百分比與對照組比較均無明顯差異。檢查體內臟器，結果顯示對照組與處理組之腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢等重要臟器均無因試驗物質引起之肉眼病理變化 (圖 1)。

組織病理檢查在對照組與處理組均出現散發性之局部極微肝細胞變性/壞死等非特異性病變，對照組雌雄鼠發生率為 2/5 及 2/5，銀耳多醣處理組雄鼠發生率為 1/5；雌鼠則為 2/5 (圖 2)，為一自發性之非特異性變化，亦常見於無特定病原 (specific patholgen free) 大鼠，與試驗物質無關。

銀耳多醣對沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 菌株之回復突變致變異性 Ames 試驗

細菌毒性測試：將銀耳多醣 30 mg/mL 的儲存濃度以蒸餾水稀釋，最終濃度為 0.12、0.6 及 3 mg/plate，與 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 (Ames 1971; Ames *et al.* 1975) 各菌株作用 18 hrs。結果如表 4 所示，銀耳多醣在 3 mg/plate 以下之不同濃度對 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 各株細菌皆無顯著細菌毒性。

Ames 測試：由銀耳多醣最高無毒性濃度向下連續 2 倍稀釋，共選取 0.1875、0.375、0.75、1.5 及 3 mg/plate 各 5 個濃度作為 Ames 正式試驗，分為直接作用於各菌株，並以大鼠肝臟活化酵素抽出液 (S9) 與上述銀耳多醣各濃度溶液共同作用 48 h，藉以模擬銀耳多醣經動物體內肝臟酵素 (S9) 代謝後之代謝產物對細菌之基因致變異性。

TA98 菌株：各濃度銀耳多醣直接對 TA98 之細菌回復突變試驗中，對照組為 29.3 ± 1.5 (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (4-NQO, 2.5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數為 150.3 ± 3.8，銀耳多醣各處理組則分別為：30.7 ± 3.5、31.7 ± 5.5、29.7 ± 5.5、26.7 ± 4.0 及 29.3 ± 4.6。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA98 之細菌回復突變菌數之對照組為 29.7 ± 5.1，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 μg /plate)

表 3. 銀耳多醣口服急毒性試驗之大鼠血清肝及腎臟功能指數變化

Table 3. Serum biochemistry changes in liver and renal function of rats after orally administered by gavage with *Tremella* polysaccharides in the acute oral toxicity test

Dose (g/kg)	AST (U/L) [z]	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Male				
Control	138.1 ± 23.5 [y]	31.5 ± 4.7	9.6 ± 1.0	0.4 ± 0.0
5	114.3 ± 36.0	33.0 ± 10.0	7.8 ± 2.4	0.5 ± 0.1
Female				
Control	154.6 ± 21.5	22.9 ± 1.8	14.1 ± 2.2	0.5 ± 0.0
5	94.6 ± 14.0	20.6 ± 2.6	9.8 ± 1.8	0.5 ± 0.1

[z] AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen.

[y] Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

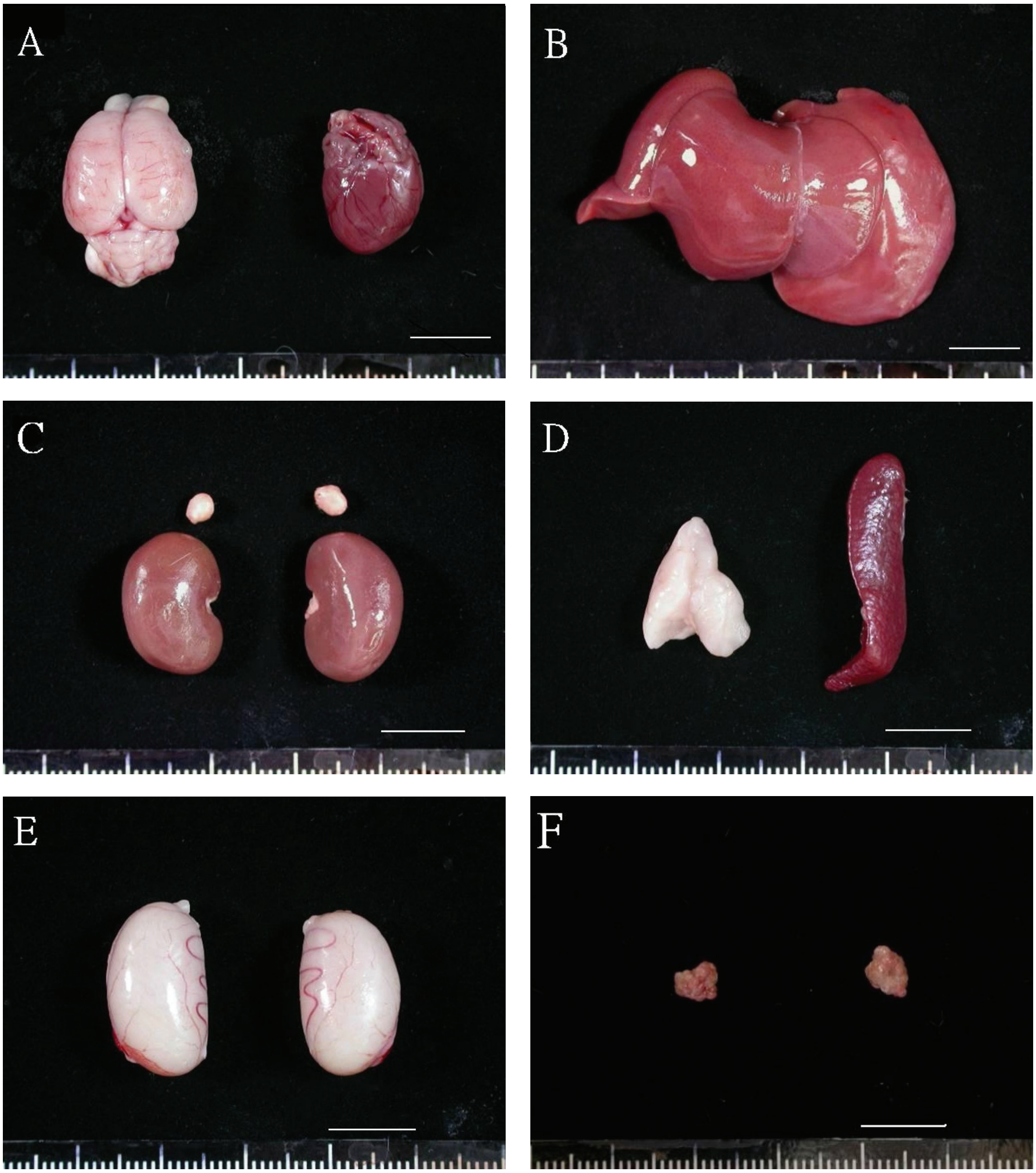

圖 1. 銀耳多醣口服急毒性試驗處理組大鼠體內臟器之肉眼病理觀察。(A) 腦及心；(B) 肝；(C) 腎及腎上腺、(D) 胸腺及脾；(E) 睪丸；(F) 卵巢 (animal ID. 401 and 406) 等重要臟器均無明顯肉眼病理變化。 (尺標 = 1.0 cm)

Fig. 1. Organs removed from rats at 14 days after gavaged with *Tremella* polysaccharides showing no visible symptoms or lesions. (A) brain (left) and heart (right), (B) liver, (C) kidney (bottom) and adrenal gland (top), (D) thymus (left) and spleen (right), (E) testes, (F) ovary. Aanimal ID. 401 and 406 group. (bar = 1.0 cm)

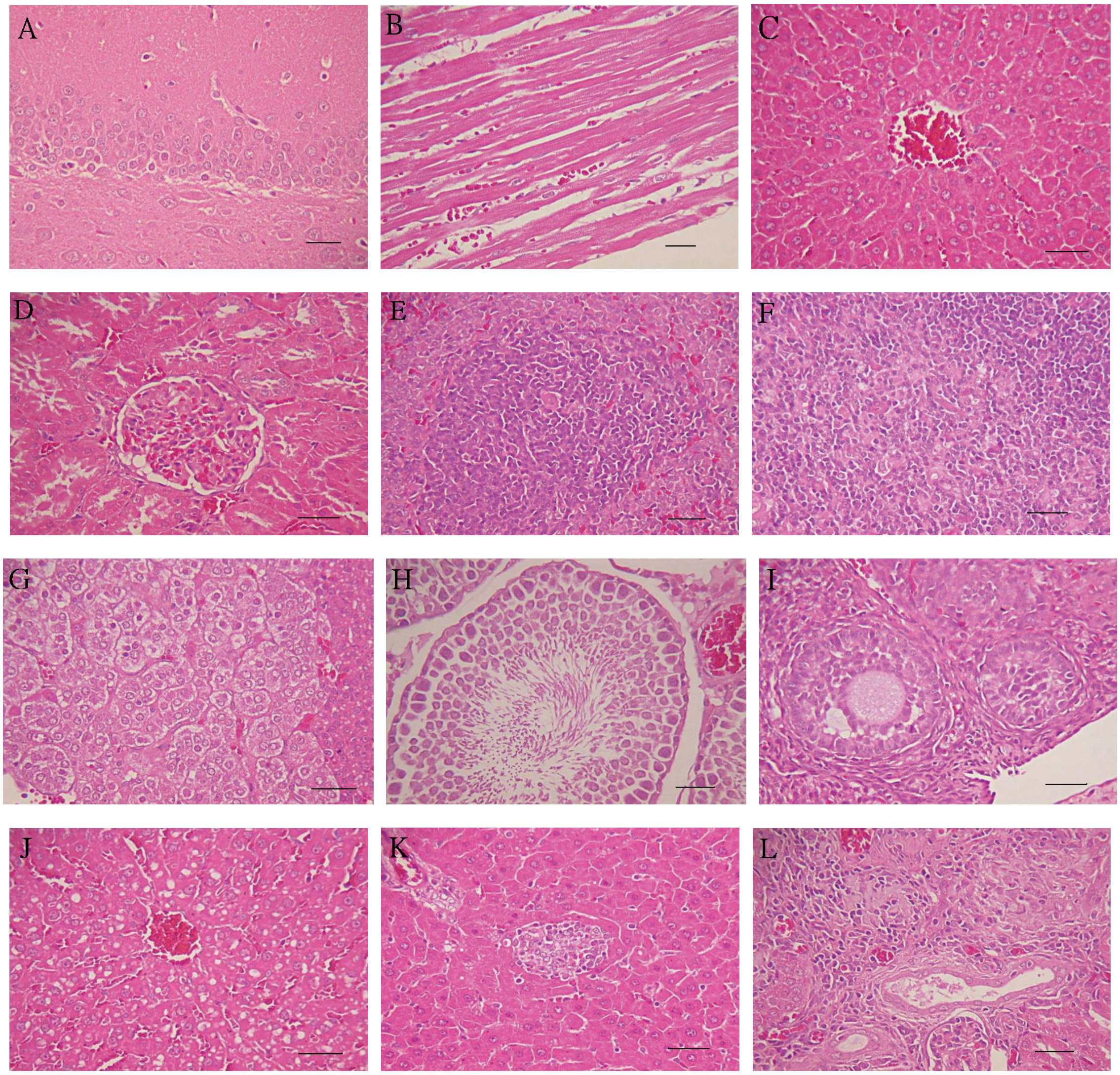

圖 2. 銀耳多醣口服急毒性試驗處理組大鼠體內臟器之組織病理觀察。(A) 大鼠腦；(B) 心臟；(C) 肝臟；(D) 腎臟；(E) 脾臟；(F) 胸腺；(G) 腎上腺；(H) 睪丸(動物編號：201)、卵巢 (I) (動物編號：310) 等重要臟器均無明顯組織病理變化。各處理組僅少數大出現輕微；(J) 肝壞死及；(K) 細胞空泡化；一隻雌鼠發生間質性腎炎；(L) (動物編號：209)，爲自發性病變 (H&E stain, 200×)。(尺標 = 1.0 cm)

Fig. 2. Histopathology of *Tremella* polysaccharides treated rats in the acute oral toxicity test showing no lesions on brain (A), heart (B), liver (C), kidney (D), spleen (E), thymus (F), adrenal gland (G), testes (H) (animal ID. 201), and ovary (I) (animal ID. 310). Few rats showed minimal necrosis, (J) and hepatic vacuolization, (K) in liver. Only one female rat (animal ID. 209) shows slight interstitial nephritis, (L) (Hematoxylin & Eosin stain, 200×). (bar = 1.0 cm)

表 4. 銀耳多醣粉末對沙門菌之細菌毒性試驗

Table 4. Toxicity of *Tremella* polysaccharides (TP) on *Salmonella typhimurium* mutant strains

Tester strains	Bacterial concentration	TP Conc. (mg/plate)/No. of revertanted (colony, CFU/plate)			
		0 y,*	0.12 *	0.6 *	3 *
TA98	10^{-6}	196.0 ± 9.3 z	191.7 ± 6.9	191.3 ± 10.7	187.3 ± 8.3
	10^{-7}	18.3 ± 2.6	21.0 ± 1.4	19.3 ± 3.9	18.0 ± 3.6
TA100	10^{-6}	98.0 ± 6.5	104.7 ± 7.9	103.7 ± 9.0	96.3 ± 6.5
	10^{-7}	11.7 ± 2.6	10.3 ± 0.9	9.7 ± 1.2	13.3 ± 1.7
TA102	10^{-6}	221.7 ± 7.5	227.7 ± 3.4	234.7 ± 16.2	226.0 ± 2.2
	10^{-7}	24.7 ± 2.9	26.0 ± 2.2	25.0 ± 0.8	23.7 ± 3.1
TA1535	10^{-6}	169.7 ± 2.1	166.7 ± 3.4	168.0 ± 2.2	163.3 ± 1.9
	10^{-7}	16.7 ± 1.2	15.7 ± 0.5	17.7 ± 0.9	16.0 ± 1.6
TA1537	10^{-6}	114.0 ± 0.8	116.3 ± 1.7	115.0 ± 1.4	116.0 ± 2.2
	10^{-7}	15.7 ± 2.1	15.0 ± 0.8	15.7 ± 1.9	15.3 ± 0.9

z Data are expressed as the mean ± SD (n = 3).

y,* Significant difference between the blank control and treated groups at $p < 0.05$.

之細菌回復突變菌數爲 135.3 ± 9.7，約爲對照組增加 4 倍以上。銀耳多醣在各處理組則分別爲：30.7 ± 2.5、30.0 ± 4.4、32.7 ± 3.1、33.0 ± 4.6 及 30.7 ± 0.6。結果顯示，銀耳多醣對 TA98 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

TA100 菌株：各濃度銀耳多醣直接對 TA100 進行細菌回復突變試驗，對照組爲 123.3 ± 17.8 (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Sodium azide, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數爲 1838.0 ± 53.3，而銀耳多醣各處理組則分別爲：132.7 ± 13.7、125.3 ± 17.2、138.0 ± 6.2、115.3 ± 3.5 及 125.0 ± 8.7。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA100 之細菌回復突變菌數之對照組爲 135.0 ± 8.2，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數爲 730.0 ± 32.0，銀耳多醣在各處理組則分別爲：132.7 ± 3.5、141.7 ± 9.1、123.3 ± 3.2、125.7 ± 5.0 及 129.0 ± 6.1。結果顯示，銀耳多醣對 TA100 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

TA102 菌株：各濃度銀耳多醣直接對 TA102 進行細菌回復突變試驗，對照組爲 336.0 ± 23.6 (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Mitomycin C, 0.5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數爲 1012.3 ± 90.5，銀耳多醣各處理組則分別爲：341.7 ± 24.1、360.7 ± 15.5、335.0 ± 9.5、342.3 ± 18.7 及 347.7 ± 18.8。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA102 之細菌回復突變菌數之對照組爲 382.7 ± 18.4，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數爲 1295.3 ± 85.2，銀耳多醣各處理組則分別爲：392.0 ± 14.4、386.0 ± 7.2、381.3 ± 27.7、382.7 ± 20.4 及 400.0 ± 12.1。結果顯示，銀耳多醣對 TA102 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

TA1535 菌株：各濃度銀耳多醣直接對 TA1535 進行細菌回復突變試驗，對照組爲 9.0 ± 1.7 (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (Sodium azide, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數爲 468.7 ± 7.6，銀耳多醣各處理組則分別爲：9.3 ± 2.1、9.0 ± 1.0、8.3 ± 0.6、9.0 ± 1.7 及 9.7 ± 1.5。各濃度銀耳多

表 5. 銀耳多醣粉末對沙門菌菌株之致突變試驗

Table 5. Mutagenicity of *Tremella* polysaccharides (TP) on *Salmonella typhimurium* mutant strains

Tester strains	Liver microsomal enzymes	Conc. (mg/plate)/Number of revertants (colony, CFU/plate)						
		NC [z]	PC [y]	0.1875	0.375	0.75	1.5	3
TA98	− S9	29 ± 2 [x]	150 ± 4 [w,]*	31 ± 4	32 ± 6	30 ± 6	27 ± 4	29 ± 5
	+ S9	30 ± 5	135 ± 10 *	31 ± 3	30 ± 4	33 ± 3	33 ± 5	31 ± 1
TA100	− S9	123 ± 18	1838 ± 53 *	133 ± 14	125 ± 17	138 ± 6	115 ± 4	125 ± 9
	+ S9	135 ± 8	730 ± 32 *	133 ± 4	142 ± 9	123 ± 3	126 ± 5	129 ± 6
TA102	− S9	336 ± 24	1012 ± 90 *	342 ± 24	361 ± 16	335 ± 10	342 ± 19	348 ± 19
	+ S9	383 ± 18	1295 ± 85 *	392 ± 14	386 ± 7	381 ± 28	383 ± 20	400 ± 12
TA1535	− S9	9 ± 2	469 ± 8 *	9 ± 2	9 ± 1	8 ± 1	9 ± 2	10 ± 2
	+ S9	9 ± 1	79 ± 4 *	9 ± 2	9 ± 2	8 ± 1	10 ± 2	9 ± 3
TA1537	− S9	6 ± 1	469 ± 5 *	7 ± 1	5 ± 0	6 ± 1	6 ± 0	5 ± 1
	+ S9	9 ± 1	77 ± 5 *	9 ± 3	10 ± 3	9 ± 2	10 ± 2	8 ± 1

[z] Negative control was sterile dimethyl sulfoxide.
[y] Positive reagents without S-9 mix reactions were 2.5 μg/plate 4-nitroquinoline-N-oxide for TA98, 5 μg/plate sodium azide for TA100 and TA1535, 0.5 μg/plate mitomycin C for TA102, and 50 μg/plate 9-aminoacridine for TA1537; positive reagent with S-9 mixture was 2-aminoanthracene for all *Salmonella typhimurium* strains.
[x] Data was presented as mean ± SD.
[w,]* Significant difference in number of colonies for more than two folds between blank control and TP treated group at $p < 0.05$.

醣與 S9 作用後，對 TA1535 之細菌回復突變菌數之對照組為 9.0 ± 1.0，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數為 179.3 ± 3.5，銀耳多醣各處理組則分別為：9.3 ± 1.5、8.7 ± 1.5、8.0 ± 1.0、9.7 ± 2.1 及 9.3 ± 3.2。結果顯示，銀耳多醣對 TA1535 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

TA1537 菌株：各銀耳多醣濃度直接對 TA1537 進行細菌回復突變試驗中，在對照組為 5.7 ± 0.6 (colony, CFU/plate)，陽性對照藥劑 (9-aminoacridine, 50 μg/plate) 之細菌回復突變菌數為 469.3 ± 4.9，銀耳多醣各處理組則分別為：7.0 ± 1.0、5.0 ± 0.0、6.3 ± 0.6、6.0 ± 0.0 及 5.3 ± 0.6。各濃度銀耳多醣與 S9 作用後，對 TA1537 之細菌回復突變菌數之對照組為 9.0 ± 1.0，陽性對照藥劑 (2-AA, 5 μg/plate) 之細菌回復突變菌數為 77.0 ± 4.6，銀耳多醣在 0.1875、0.375、0.75、1.5 及 3 mg/plate 各處理組則分別為：9.3 ± 3.2、10.3 ± 3.2、9.0 ± 2.0、9.7 ± 2.1 及 8.0 ± 1.0。結果顯示，銀耳多醣對 TA1537 菌株並無明顯致變異性 (表 5)。

討 論

銀耳子實體為衛生署公告 203 種「可食用中藥材」之一，研究顯示銀耳多醣具有提升免疫力 (Gao *et al*. 1996; Xia *et al*. 1989)，降低肝臟肝糖及血漿中膽固醇含量 (Kiho *et al*. 1994)，之功效，口服試驗劑量為 50–300 mg/kg 。市場上已有銀耳多醣相關產品販售，惟顯少對於大量、長期食用之安全性報告。本商品化銀耳多醣產品，其毒理安全性評估試驗顯示，銀耳多醣對大鼠之血液值，體

內臟器重量包括腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢重量及百分比等均無與試驗物質有關之影響，口服急毒性 LD_{50} 值爲大於 5 g/kg body weight。研究顯示人蔘多醣 (Ivanova *et al.* 2006) 具有預防副射引發之基因突變之作用，桑黃多醣及柳松菇多醣 (Shon *et al.* 2001) 對直接或間接誘發之突變劑均具有抗突變之作用，銀耳多醣產品之 Ames 試驗結果顯示，不論添加 S9 與否，對沙門菌 (TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537) 菌株均不具有致變異性，對細菌基因突變測試結果爲陰性反應，由以上試驗結果可知銀耳多醣爲高安全性的物質。

引用文獻 (Literature cited)

Ames, B. N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. p.267–282. *in*: Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol. 1. (Hollander. A., ed.) Plenum Press. New York and London.

Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31:347–364.

Baets, S. De and E. J. Vandamme. 2001. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. Biotech. Lett. 23:1361–1366.

Chan, P. K. and A. W. Hayes. 1994. Acute toxicity and eye irritancy. p.579–648. *in*: Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A. W., ed.) 3rd ed. Raven Press. New York.

Copplestone, J. F. 1988. The development of the WHO recommended classification of pesticides by hazard. Bull. W. H. O. 66:545–551.

Gao, Q. P., R. Z. Jiang, H. Q. Chen, E. Jensen, and R. Seljelid. 1996. Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. Planta Med. 62:297–302.

Gosselin, R. E., R. P. Smith, and H. C. Hodge. 1984. Ingredient Index. p.1–5. *in*: Clinical Toxicology of Commercial Products, Acute Poisoning, Section II. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.

Ivanova, T., Y. Han, H. J. Son, Y. S. Yun, and J. Y. Song. 2006. Antimutagenic effect of polysaccharide ginsan extracted from Panax ginseng. Food Chem. Toxicol. 44(4):517–521.

Kiho, T., Y. Tsujimura, M. Sakushima, S. Usui, and S. Ukai. 1994. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *Tremella fuciformis*. Yakugaku Zasshi 114(5):308–315.

Japanese Ministry of Health and Welfare. 1997. Guidelines for toxicity studies of drugs. p.272–290. *in*: Japanese Technical Requirements for New Drug Registration, with Relevant Japanese and ICH Guidelines Collected in Appendix, Appendix (21) S4 (ICH). Yakuji Nippo, Ltd. Tokyo.

Liang, C. T., M. H. Chang, C. C. Hong, and K. J. Huang. 1999. Establishing the blood chemistry reference values for SPF rats and mice. J. Chin. Soc. Sci. 25:55–68.

Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res. 113:173–215.

Mortelmans, K. and E. Zeiger. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res. 455(1-2):29–60.

Shackelford, C., G. Long, J. Wolf, C. Okerberg, and R. Herbert. 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. Toxicol. Pathol. 30:93–96.

Shon, Y. H. and K. S. Nam. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. J. Ethnopharmacol. 7(1):103–109.

Xia, D. and Z. B. Lin. 1989. Effects of *Tremella* polysaccharides on immune function in mice. Acta Pharmacol. Sin. 10:453–457. (in Chinese)

You, B. Y. 1987. Short-Term Tests for the Detection of Chemical Genotoxicity: I. Salmonella /Microsome Reversion Assay, Ames test. ATD Tech. Bull. No.1. TACTRI. Taichung. 15 pp. (in Chinese)

Yu, J. Y. L., C. K. Cheng, B. J. Chen, M. J. Cheng, H. H Cheng, W. J. Chang, H. C. Chen, C. C. Hong, P. J. Lee, S. C. Liang, K. S. Sheu, Y. Y. Sung, C. N. Weng, C. W. Tsai, C. S. Wang, M. H. Wang, L. S. Yen, C. K. Yu, and J. Y. L. Yu. 2005. A Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals. 3rd ed. Chinese Society for the Laboratory Animal Science Pub. Taipei, Taiwan. 207 pp. (in Chinese)

Zeng, C. L. 1994. Zeng Shih Veterinarian Hematology. Yi Hsien Publishing Co., Ltd. Taipei, Taiwan, 520 pp. (in Chinese)

Evaluation for Toxicology and Mutagenicity of *Tremella* Polysaccharide Extracted from *Tremella fuciformis*, Berk[1]

Shu-Hui Yang[2,5], Kun-Chao Chen[3], Jhaol-Huei Wu[3], and Jiunn-Wang Liao[4]

Abstract

Yang, S. H., K. C. Chen, J. H. Wu, and J. W. Liao. 2008. Evaluation for toxicology and mutagenicity of *Tremella* polysaccharide extracted from *Tremella fuciformis*, Berk. J. Taiwan Agric. Res. 57:243–255.

According to the Chinese medicine records, *Tremella fuciformis* possesses some beneficial effects to lungs and stomach. Our previous study has showed that *Tremella* polysaccharides (TP) extracted from fruiting bodies of *T. fuciformi*and were effective in relieving symptoms of constipation. Present study was conducted to determine TP for toxicity in rats using acute oral toxicity test and mutagenesis in bacterial cultures of *Salmonella typhimurium*, using Ames test. Each rat (SD strain) was gavaged with TP at a dose of 5 g/kg body weight and then observed daily for a period of 14 days. Results showed that, compared to controls, all TP-treated rats survived after 14 days and no significant difference in body weight between treated and controls. There was no sifnificant difference between control and TP-treated rats in hematological and biochemistry parameters, white blood cell and pathology of main internal organs. The rat feeding trial suggests that the acute oral LD_{50} value of TP is greater than 5 g/kg body weight. Furthermore, Ames test of TP on Salmonella typhimurium strains TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 showed that, either in the presence or absence of S9 TP treatment caused no reverse mutagenicity in all five strains tested, compared to negative control. In conclusion, Tremella polysaccharides are safe based on the evidence of no acute oral toxicity on rats and no reverse mutation of strains of *Salmonella typhimurium*.

Key words: *Tremella fuciformis*, Polysaccharides, Rats, Acute oral toxicity, S*almonella typhimurium*, Ames test.

---

1. Contribution No. 2333 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: October 23, 2008.
2. Assistant Researcher, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Station, ARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
3. Assistants, Animal Disease Diagnostic Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Associate Professor, Graduate Institute of Veterinary Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponding author, e-mail: debbbie@fthes-tari.gov.tw; Fax: (07)7315590.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):256–264 (2008)

德國消費者對台灣椪柑消費偏好之研究[1]

江秀娥[2] 楊世華[2,3] 潘德芳[2]

摘　　要

江秀娥、楊世華、潘德芳。2008。德國消費者對台灣椪柑消費偏好之研究。台灣農業研究 57:256–264。

基於台灣椪柑具有多汁香甜特性，如能進一步取得歐洲消費者對台灣椪柑之接受度資料加以驗證，可作爲擬具出口規劃之參考。因此，本研究以德國爲例，在 2007 年採用消費者試吃調查方式，蒐集到 300 位德國消費者對台灣椪柑之試吃意見等資料，以 Logit 模型測定其消費者人口特性與經濟特性對台灣椪柑之偏好程度，作爲拓展外銷市場之參考。研究結果發現：有 8 成 3 的德國受訪者表示喜歡吃台灣椪柑，顯示對於台灣椪柑的風味及品質，具有相當高的認同度；進一步分析受訪者之特性，發現受訪者爲女性、年長者、個人月收入在 2,000 歐元以下者，相對上喜歡吃台灣椪柑，是可以拓銷的對象。再者，考慮德國受訪者的月所得及願付價格等條件，台灣椪柑宜採平價策略，以爭取消費者之購買。然而要達到平價策略的價格優勢，應妥善規劃台灣椪柑的保鮮處理與運輸成本控管等相關因素。

關鍵詞：椪柑、消費偏好、Logit 模型。

前　　言

農產品外銷有別於產品內銷，尤其是國外消費者人口特質與經濟特質宜先行了解。消費者在那裡？產品形象價格是否可與消費者連在一起？國外市場之尋找雖有不同方法，促銷亦是其中一種。然而，促銷各方投入較多，試吃調查也是一種選擇，終究是探尋國外市場消費者群及掌握產品更優的銷售條件，以促進外銷技術功能。有鑑於此，我們以椪柑做爲試吃調查的產品，由於柑桔類是歐洲進口新鮮水果前五名量值產品，近 5 百萬噸，約 25 億美元，尤其雖然歐洲產柑橘國家主要集中在西班牙與意大利；然而有些歐洲國家，柑橘的進口是來自於歐洲以外地區，如德國、法國、英國、荷蘭與比利時等。

目前，台灣椪柑 (學名爲 *Citrus reticulata* Blanco) 的種植面積爲約 6800 ha，總產量約 90,000 t，總產值 20 億餘元，仍爲國內重要果樹產業之一。產地主要集中在嘉義縣、台中縣、台南縣及

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2334 號。接受日期：97 年 10 月 29 日。
2. 本所農業經濟組助理研究員、副研究員與研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：shyang@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23399611。

苗栗縣等地。近十年來，台灣椪柑的種植面積呈現減少，由 1998 年的約 9500 ha，降至 2007 年的約 6800 ha，減少幅度近 4 成。對於經營者來說，了解消費者行爲可以幫助銷售活動的進行 (Uang 2007)。爲求能提升椪柑產業的發展，台灣椪柑是否有機會拓展外銷，增加果農的通路機會，是值得探討的課題。

基於我國椪柑具有多汁香甜特性，如能進一步取得歐洲消費者對我國椪柑之接受度資料加以驗證，可作爲擬具出口規劃之參考。因此，本研究以德國爲例，在 2007 年採用消費者試吃調查方式，蒐集德國消費者對台灣椪柑之試吃意見，作爲分析之依據。並以計量經濟方法測定其消費者人口特性與經濟特性對台灣椪柑之偏好程度，作爲拓展外銷市場之參考。再依據分析結果，提出相關資訊給相關研究人員與生產者，作爲研發符合市場需求的產品，或是因應市場需求調整生產策略之參考。

材料與方法

Logit 模型

本研究採用受限應變數模型 (limited dependent-variable models) 中之 Logit 模型。由於許多現象的設定是不連續的 (discrete)，如決定是否要找工作，或是否要進行購買行爲等。以是否要找工作而言，直覺上可能受到年齡、教育程度、婚姻狀況或其他經濟相關因素的影響。這就是質性反應模型 (qualitative response models, QR models)，應變數是不連續的出象 (outcome)，如受訪者之反應爲「要」或是「不要」，以及「買」或是「不買」等決定，若是用傳統的迴歸方法來進行分析，是不適當的 (Greene 2000)。

進行消費者消費行爲之研究時，Logit 模型是常會被應用到的模型，如 Lin *et al.* (2003) 用以分析台北地區家庭購買溫體與冷凍 (或冷藏) 豬肉的消費行爲，研究結果發現：購買者年齡愈大、同住家人數愈多愈傾向購買溫體豬肉；教育程度愈高、家庭月所得愈高的購買者則愈傾向購買冷凍冷藏豬肉。Pan & Yang (1998) 用以探討台北市、台中市及高雄市地區玫瑰消費者的消費行爲，研究結果發現：玫瑰重度購買者之特性包括年紀較輕者、高個人所得及高家庭所得等，因玫瑰主要用途在於送禮表達情意，是以在產品品質與包裝設計上均非常重要。Labeaga *et al.* (2007) 用以分析西班牙消費者對洗衣粉品牌的購買忠誠度，研究結果發現：一旦家計單位嘗試品牌，大多數將在往後持續購買，而且對於全球性品牌，有較大的重複性選擇行爲。

本研究使用二元出象模型 (binary outcome models) 來進行分析，至於應該使用何種二元出象模型較爲恰當，實證上並無定論。然而根據 Cameron & Trivedi (2005) 指出，Logit 模型之概似函數對數值 (log-likelihood value) 高於 Probit 模型，因此本研究採用 Logit 模型。

Logit 模型係由對數機率函數 (log probability function) 轉換而來。假設應變數 y 僅有兩種可能出象，$y_i = 1$ 表示事件發生，$y_i = 0$ 表示事件未發生，其發生的機率分別爲 p 和 1−p。因此，對於受訪者 i = 1, 2,…, N，在給定 $K \times 1$ 之解釋變數向量 x (其對應之參數向量β) 下，將事件發生的條件機率定爲 $P(y_i = 1| x_i) = p_i$，我們就能得到下列 Logistic 迴歸函數：

$$p_i \equiv \Pr[y_i = 1 | x] = \Lambda(x_i^{'}\beta) = e^{x_i^{'}\beta} / (1 + e^{x_i^{'}\beta}) \tag{1}$$

(1) 式中，$\Lambda(.)$ 代表是羅吉斯特累加分配函數 (Logistic cumulative distribution function)。其中，p_i 爲第 i 個受訪者發生事件的機率，它是一個由變數 x_i 構成的非線性函數 (non-linear function)。然

而，這個非線性函數可以被轉換爲線性函數 (Wang & Guo 2005)。首先，定義不發生事件的條件機率爲

$$1-\mathrm{p}_i = 1-\frac{e^{x'\beta}}{1+e^{x'\beta}} = \frac{1}{1+e^{x'\beta}} \tag{2}$$

那麼，事件發生機率與事件不發生機率之比爲

$$odds_i = \frac{p_i}{1 \quad p_i} = e^{x'\beta} \tag{3}$$

這個比被稱爲事件的發生比 (odds of experiencing an event)，簡稱爲 odds。比如一個事件發生的機率 ($\mathrm{p_i}$) 爲 0.6，那麼事件不發生的機率 ($1-\mathrm{p_i}$) 即 0.4，於是發生比等於 0.6 ÷ 0.4 = 1.5。這意味著，事件發生之可能性是不發生之可能性的 1.5 倍；或者說，我們期望看到對應每一次事件不發生，則有 1.5 次事件發生。

將 odds 取自然對數就能得到一個線性函數，稱作 Logit 模型，如 (4) 式所示。

$$\ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = x'\beta \tag{4}$$

由於每一個受訪者 i 的機率密度函數可表示爲 $f(y_i \mid x_i) = p_i^{y_i}(1-p_i)^{(1-y_i)}$，$y_i$=0,1，則在 N 個樣本獨立取得之下，其對數型態之概似函數可表示爲：

$$\ell_N(\beta) = \sum_{i=1}^{N}\{y_i \ln \Lambda(x_i'\beta) + (1-y_i)\ln[1-\Lambda(x_i'\beta)]\} \tag{5}$$

參數β之估計，採用最大概似估計式 (maximum likelihood estimator, MLE) 方法，所得結果以 $\hat{\beta}_{ML}$ 表示。

模型的評估

本研究之模型評估重點，在於模型配適度 (Goodness of fit) 的檢定，以及解釋變數顯著性之測定。有關配適度之檢定，可分爲「模型卡方統計」(model chi-square statistic) 及「預測準確度」(Wang & Guo 2005)。

模型卡方統計：用以檢定模型配適度，爲估計參數之聯合顯著性檢定，所計算之概似比例檢定值 (likelihood ratio test statistic, *LR* statistic)，即「-2 LogL」，爲服從自由度爲所有估計參數數目減一之卡方分配，當該檢定值大於某一顯著水準下之卡方臨界值時，即棄卻虛無假設 H_0，而接受至少有一參數值不爲 0 之對立假設。

預測準確度：用以表示模型之預測能力，其中，總正確率爲被正確分類的案例數 (受訪者人數) 和案例總數 (受訪者總人數) 之比。

Logit 迴歸係數之解釋

對 Logit 迴歸係數進行解釋時，很難具體把握以對數所測量的作用幅度，所以通常將以 Logit 推導的作用，轉換爲對應的發生比率 (Wang & Guo 2005)。因爲理解發生比是比較容易，Logit 模型可以按事件發生比的形式寫爲：

$$\text{odds}_i = \frac{p_i}{1-p_i} = \exp(\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3) = e^{\alpha} \times e^{\beta_1 x_1} \times e^{\beta_2 x_2} \times e^{\beta_3 x_3} \quad (6)$$

當β_k 爲正值時，e^{β_k} 將大於 1，這就是說，x_k 每增加一個單位時，發生比會相對增加。當β_k 爲負值時，e^{β_k} 將小於 1，說明x_k 每增加一個單位時，發生比會相對減少。當β_k 爲 0 時，e^{β_k} 將等於 1，那麼x_k 不論怎麼變化，發生比都不會變化。發生比的變化由e^{β_k} 所代表，實際上它就是一個發生比率。是以，可用發生比率針對各種自變數 (如連續變數、二分變數及分類變數) 的 Logit 迴歸係數，進行解釋 [1]。

實證模型之設定

因此，實證模型的設定表示如下：

$$\begin{aligned} Like_i &= \beta_0 + \beta_1 \cdot Gender + \beta_2 \cdot Age-group\,1 + \beta_3 \cdot Age-group\,2 + \beta_4 \cdot Age-group\,3 \\ &\quad + \beta_5 \cdot Income\,1 + \beta_6 \cdot Income\,2 + \beta_7 \cdot Wp\,1 + \beta_8 \cdot Wp\,2 + \varepsilon \end{aligned} \quad (7)$$

其中，應變數方面，Like 爲受訪者對台灣椪柑的喜好 (是否喜歡吃台灣椪柑)，「喜歡吃」，則 Like = 1；「不喜歡吃」，則 Like = 0。自變數方面，Gender 爲受訪者性別 (男性 = 1，女性 = 0)，Age-group 1、Age-group 2 及 Age-group 3 表示年齡變數 [2]，Income 1 及 Income 2 表示個人月所得變數 [3]，Wp 1 及 Wp 2 表示願付價格變數 [4]。有關各變數之定義及其敘述統計，詳見表 1。

表 1. 德國消費調查之模型變數定義及其敘述統計

Table 1. Definition of variables and descriptive statistics of the consumer survey in Germany

Variable	Definition	Mean
Like	Do you like to eat Taiwan ponkan? 1 = Yes; 0 = No	0.83
Gender	1 = Male; 0 = Female	0.43
Age-group 1	1 = 21–40 years old; 0 = otherwise	0.43
Age-group 2	1 = 41–60 years old; 0 = otherwise	0.34
Age-group 3	1 = 61 years old and above; 0 = otherwise	0.16
Income 1[z]	1 = 1,000 Euro and under; 0 = otherwise	0.37
Income 2	1 = 1,001–2,000 Euro; 0 = otherwise	0.36
Wp 1[y]	1 = 2.0 Euro per kilogram and under; 0 = otherwise	0.43
Wp 2	1 = 2.1–3.0 Euro per kilogram; 0 = otherwise	0.47

[z] Income = personal income per month of the respondent.

[y] Wp = willingness to pay for the price of Taiwan ponkan.

[1] 詳細內容可參考 Wang & Guo (2005) 的第四章。

[2] 在年齡方面，本研究分成四類，其中，參照類爲 20 歲及以下。

[3] 在個人月所得方面，本研究分成三類，其中，參照類爲 2,001 歐元及以上。

[4] 在願付價格方面，本研究分成三類，其中，參照類爲 3.1 歐元/公斤及以上。

資料來源

2007 年 11 月，本研究將台灣椪柑運送至德國 [5]，並以德國漢堡市、柏林市及慕尼黑等三個城市消費者爲研究對象 [6]，採立意抽樣方式，進行消費者試吃台灣椪柑之調查，蒐集到 300 份德國消費者對於台灣椪柑之消費偏好及購買意願等資料，作爲分析之依據。

有關受訪者之人口變數特性，如表 2 所示。其中，喜歡吃椪柑的比率達 83.0%；受訪者以女性占大多數，占 57.3%；受訪者年齡以 31–40 歲占 24.0%爲最多，其次爲 41–50 歲占 21.0%；個人月所得以 1,000 歐元及以下爲最多，達 37.3%，其次爲 1,001–2,000 歐元占 36.3%。

結　　果

受訪者對台灣椪柑之偏好統計

在德國消費者試吃台灣椪柑後，針對反映的資料進行簡單統計，所獲得受訪者對於台灣椪柑之偏好統計，如表 3 所示。試吃的評價項目有四項，分別爲甜度 (sweetness)、酸度 (acidity)、果汁含量 (juice content) 及果肉質地 (texture)，其中以「果汁含量」的滿意度爲最高，達 91.6%，其他

表 2. 德國受訪者之人口變數特性

Table 2. Demographic summary statistics of surveyed consumers in Germany ($N = 300$)

Variable	Items	Number of consumers	%
Like	Yes	249	83.0
	No	51	17.0
Gender	Male	128	42.7
	Female	172	57.3
Age	20 years old and below	21	7.0
	21–30 years old	56	18.7
	31–40 years old	72	24.0
	41–50 years old	63	21.0
	51–60 years old	40	13.3
	61 years old and above	48	16.0
Income	1,000 Euro and below	112	37.3
(Euro per month)	1,001–2,000 Euro	109	36.3
	2,001–3,000 Euro	52	17.3
	3,001–4,000 Euro	16	5.3
	4,001 Euro and above	11	3.7

[5] 本次試吃椪柑的等級爲周徑 23 cm。

[6] 在德國的試吃調查地點，分別於漢堡市中心附近的市集、柏林市圍牆附近的市集及慕尼黑的的百貨公司。

表 3. 德國受訪者對台灣椪柑消費偏好之統計

Table 3. Summary statistics of the consumer preference for Taiwan ponkan in Germany

Item of ponkan surveyed	Rating criteria	Number of consumers	%
Sweetness	Too sweet	5	1.7
	Adequate	260	86.6
	Not sweet enough	35	11.7
Acidity	Too high (acidic)	7	2.3
	Adequate	256	85.4
	Too low	37	12.3
Juice content	Too high	5	1.7
	Adequate	275	91.6
	Too low	20	6.7
Texture	Too soft	39	13.0
	Good	246	82.0
	Too tough	15	5.0

三項的滿意度均在 80%以上，整體而言，顯示德國受訪者對於台灣椪柑的風味及品質，具有相當高的認同度。

對台灣椪柑消費偏好之參數估計結果

使用 SPSS 之計量軟體 (Wu & Twu 2008)，以 Logit 模型來估計德國消費者對台灣椪柑消費偏好，表 4 呈現估計之結果。

首先探討模型之配適度 (goodness-of-fit)，本研究中使用正確預測百分比及概似比檢定統計量 (likelihood ratio test statistic; *LR* statistic) 等指標。在 300 受訪者中有 249 位受訪者喜歡吃台灣椪柑；整體而言，預測正確率則爲 83.0%。至於 *LR* 檢定統計量的值爲 27.09，在自由度爲 8 的卡方分配，則 P 值爲 0.001；整體而言，模型的配適度良好。

在 Logit 模型之參數估計方面，顯示受訪者爲女性、61 歲以上年長者、個人月收入在 2,000 歐元及以下者，相對上喜歡吃台灣椪柑。以下再針對達到顯著水準之自變數的 Logit 迴歸係數，進行探討。在性別方面，係數 (β) 爲負值，其 Exp(β) = 0.537；表示在其他條件不變下，男性的受訪者，喜歡吃台灣椪柑的發生比，約爲女性的 0.5 倍，相對上較不喜歡吃台灣椪柑。在年齡方面，變數 Age-group 3 (61 歲及以上) 的係數 (β) 爲正值，其 Exp(β) = 6.24；因本研究將年齡分成四類，其中，參照類爲 20 歲及以下；表示在其他條件不變下，61 歲以上年長喜歡吃台灣椪柑的發生比，約爲參照類的 6.2 倍。在個人月所得方面，變數 Income 1 (1,000 歐元以下) 及變數 Income 2 (1,001–2,000 歐元) 的係數 (β) 爲正值，其 Exp(β) 分別爲 3.039 及 2.001；因本研究將個人月所得分成三類，其中，參照類爲 3,001 歐元及以上；表示在其他條件不變下，個人月所得爲 1,000 歐元以下或 1,001–2,000 歐元的受訪者，喜歡吃台灣椪柑的發生比，約爲參照類的 3 倍與 2 倍。

表 4. 德國受訪者對台灣椪柑消費偏好之羅吉特模型參數估計

Table 4. Parameter estimates of the Logit model for surveying consumer preference for Taiwan ponkan in Germany (N = 300 [z])

Variable	Coefficient β	Std. Err. [y]	Exp (β)
Constant	0.873	0.872	– [x]
Gender	-0.621*[,w]	0.330	0.537
Age-group 1	0.437	0.661	1.548
Age-group 2	0.357	0.678	1.429
Age-group 3	1.831*,*	0.878	6.240
Income 1	1.111*,*	0.446	3.039
Inomec 2	0.693*	0.397	2.001
Wp 1	-0.604	0.576	0.547
Wp 2	0.444	0.586	1.560
LR statistic	27.09		
Percent correctly predicted (%)	83.0		

[z] Number of total observations = 300; number of zero observations = 51.
[y] Std. Err. indicates standard error.
[x] –: indicates not provided.
[w,] * significant at 10%; ** significant at 5%; *** significant at 1%.

討　　論

基於台灣椪柑具有多汁香甜特性，如能進一步取得歐洲消費者對台灣椪柑之接受度資料加以驗證，可作爲擬具出口規劃之參考。因此，本研究以德國爲例，在 2007 年採用消費者試吃調查方式，蒐集到 300 位德國消費者對台灣椪柑之試吃意見等資料，以計量經濟方法測定其消費者人口特性與經濟特性對台灣椪柑之偏好程度，作爲拓展外銷市場之參考。

研究結果發現：有 8 成 3 的德國受訪者表示喜歡吃台灣椪柑，顯示對於台灣椪柑的風味及品質，具有相當高的認同度；進一步分析受訪者之特性，發現受訪者爲女性、年長者、個人月收入在 2,000 歐元以下者，相對上喜歡吃台灣椪柑。

依據研究結果，謹提出以下之建議：(1) 台灣椪柑在外銷德國時，可針對具有此三項特徵的消費者從事行銷活動，以掌握主要的市場消費群。(2) 相對上喜歡吃台灣椪柑的德國消費者，屬於中低收入者，也要考慮他們的願付價格，因此若要有市場競爭優勢，定價方面宜採平價策略，以爭取消費者之購買。(3) 歐洲市場距離台灣較遠，要達到平價策略的價格優勢，台灣椪柑的保鮮處理與運輸成本控管等方面，是需要妥善規劃，且是攸關勝敗的關鍵。

引用文獻 (Literature cited)

Cameron, A. C. and P. K. Trivedi. 2005. Microeconometrics: Methods and Applications. Cambridge Univ. Press. 1034 pp.

Greene, W. H. 2000. Econometric Analysis. 4 th ed. Prentice Hall International Inc. 1004 pp.

Labeaga, J. M., N. Lado, and M. Martos. 2007. Behavioural loyalty towards store brands. J. Retailing and Consumer Services 14:347–356.

Lin, C. Y., C. M. Pan, and H. M. Wu. 2003. The analysis of household consuming behaviors of pork in the Taipei area. Taiwanese Agric. Econ. Rev. 9(1):43–62. (in Chinese with English abstract)

Pan, T. F. and S. H. Yang. 1998. A study on buying behavior of rose consumers. J. Agric. Res. China 47(2):179–186. (in Chinese with English abstract)

Uang, J. J. 2007. Consumer Behavior: an Introduction. 2nd ed. Chuan Hwa Book Co. Ltd. Taipei. 414 pp. (in Chinese)

Wang, J. C. and J. G. Guo. 2005. Logistic Regression Model: Methods and Application. 2 nd ed. Wu-Nan Culture Enterprise. Taipei. 337 pp. (in Chinese)

Wu, M. L. and J. T. Twu. 2008. SPSS & the Application and Analysis of Statistics. 2 nd ed. Wu-Nan Culture Enterprise. Taipei. 965 pp. (in Chinese)

A Study on Germany Consumers' Preferences for Taiwan Ponkan[1]

Hsiu-E Chiang[2], Shi-Hua Yang[2,3], and Te-Fang Pan[2]

Abstract

Chiang, H. E., S. H. Yang, and T. F. Pan. 2008. A study on Germany consumers' preferences for Taiwan ponkan. J. Taiwan Agric. Res. 57:256–264.

Taiwan ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) could be one of the citrus fruits with potential for export markets because of its juicy and sweet flavor. However, consumers' preference and acceptance is also an important factor in determination of export market of Taiwan ponkan. This study was conducted to survey consumers' preferences for Taiwan ponkan in Germany, using Logit model for analyses. Based on a total of 300 people surveyed in Germany in 2007, the respondents favorable for the flavor and quality of the Taiwan ponkan reached 83%, revealing a high level of acceptance of this citrus fruit. Moreover, among all consumers surveyed, the groups favorable for Taiwan ponkan were female, the elderly and people with monthly income below 2,000 Euro, suggesting that these groups would be the target of consumers for Taiwan ponkan in Germany. Therefore, consumers' income and retail price should be the main factors for consideration of exporting and marketing high-quality Taiwan ponkan in Germany.

Key words: Ponkan, Consumers' preferences, Logit model.

---

1. Contribution No.2334 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: October 29, 2008.
2. Respectively, Assistant Researcher, Associate Researcher, Researcher and Head, Agricultural Economics Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail: shyang@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23399611.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):265–278 (2008)

Characterization of Novel Strains of Citrus Canker Bacterium from Citrus in Taiwan[1]

Hsin-Cheng Lin[2,5], Hsiang Chang[3], and Kuo-Ching Tzeng[4]

ABSTRACT

Lin, H. C., H. Chang, and K. C. Tzeng. 2008. Characterization of novel strains of citrus canker bacteria from citrus in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:265–278.

Two strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolated from citrus plants in Taiwan were examined for pathogenicity on the leaves of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*), grapefruit (*C. paradisi*), Liucheng (*C. sinensis*), and lemon (*C. limon*). The results showed that two strains induced flated necrotic lesions with watersoaked margin on the leaves of four *Citrus* species. Based on physiological, biochemical, genetic and proteinic characterizations including NaCl tolerance, hydrolysis of gelatin, oxidation of carbon sources, polymerase chain reactions with primers specific to *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), rep-PCR, and SDS-PAGE analysis, these two strains were identified as *Xac* and grouped into *Xac*-A^{p} type. Both strains could be differentiated from *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (pathotype E) by oxidation of carbon sources, pectolytic activity, and amplified DNA profiles of PCR, while they could be only differentiated from type *Xac*-A^{f} strain by a distinct pathogenicity on the leaves of Mexican lime. Our data indicated they appeared to be novel strains of *Xac* in Taiwan. We designated these two atypical symptoms-inducing strains as *Xac*-A^{p} type which are different from strains of types *Xac*-A , *Xac*-A^{f}, *Xac*-A^{r}, *Xac*-A* and *Xac*-A^{w} described previously.

Key words: Citrus canker, *pthA* gene, Rep-PCR, SDS-PAGE, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*.

---

1. Contribution NO. 2335 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 5, 2008.
2. Assistant professor, Department of Biotechnology, Chung Chou Institute of Technology, Changhua, Taiwan, ROC.
3. Senior Research Fellow, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan. ROC.
4. Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponding author, e-mail: lin1368@dragon.ccut.edu.tw; Fax: (04)8394070.

INTRODUCTION

There are distinct types of citrus canker disease caused by various pathovars and variants of the bacterium *Xanthomonas axonopdis*. Because symptoms are generally similar, the separation of these forms of the bacterial pathogen is based on host range and other phenotypic and genotypic characteristics of the strains.

The Asiatic type of citrus canker (pathotype A), caused by the *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is by far the most widespread and severe form of the disease. This is the strain that causes the disease most often referred to as 'citrus canker'(Stall & Civerolo 1991). Cancrosis B (pathotype B) caused by the *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* is a minor canker disease of diminishing importance on lemons in Argentina, Paraguay, and Uruguay. Mexican lime, sour orange and pummelo are also susceptible (Civerolo 1984). Cancrosis C (pathotype C) also caused by the *X. axonopodis* pv. *Aurantifolii* that can only infect infected Mexican lime in Brazil (Schubert *et al*. 2001). Strains in pathotypes A, B and C induce raised canker lesions on citrus plants. However, Cancrosis E (pathtype E) was originally described in Florida, induce flat necrotic lesions with watersoaked margins on citrus species (Graham & Gottwald 1991; Stall & Civerolo 1991). The disease was renamed citrus bacterial spot (CBS) and the bacterium was reclassified as *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Vauterin *et al*. 1995). The typical canker lesion caused by *X. axonopodis* pv. *citri* is erumpent, with watersoaked, or oily tan or brown colored margin, often surrounded by a chlorotic halo. However, several distinct phenotypes of *Xac* have been reported (Verniere *et al*. 1998; Mohammadi *et al*. 2001; Sun *et al*. 2004; Lin *et al*. 2005). Strains from southwest Asia (*Xac*-A*) and Florida (*Xac*-A^w) elicit typical canker lesions on Mexican lime and induce flat watersoaked lesions on grapefruit (Verniere *et al*. 1998; Sun *et al*. 2004). These new strains have a limited host range in Mexican lime that differs from *Xac* strains which have a wide host range. Recently, atypical symptoms-inducing strains of type *Xac*-A^f and type *Xac*-A^r were identified in Taiwan (Lin *et al*. 2005). A strain of *Xac*-A^f induces flat necrotic lesion with watersoaked margin and light chlorotic halo on leaves of grapefruit, lemon and Liucheng, while induces typical canker lesions on Mexican lime. Strains of *Xac*-A^r induce restricted and raised corky lesions with no watersoaked margin and light chlorotic halo on leaves of citrus species.

Several approaches have been employed in studying the taxonomy and discriminating between strains of *X. axonopodis* belonging to various pathotypes including physiological and biochemical assays (Verniere *et al*. 1991; Verniere *et al*. 1993), serological approaches (Civerolo & Fan 1982; Alvarez *et al*. 1991), phage typing (Verniere *et al*. 1998), protein profiles (Vauterin *et al*. 1991), fatty acid analysis (Graham *et al*. 1990; Vauterin *et al*. 1991), DNA-DNA hybridization (Vauterin *et al*. 1991), restriction-fragment length polymorphism (Hartung & Civerolo 1989; Graham *et al*. 1990), plasmid DNA fingerprints (Pruvost *et al*. 1992), and specific primer pairs (Hartung *et al*. 1993; Cubero & Graham 2002; Sun *et al*. 2004). In addition, Southern hybridization with a *pth*A probe reveals distinct profiles among strains in pathotype A, pathotype B, pathotype C, and pathotype E (Swarup *et al*. 1992). And rep-PCR with BOX and ERIC primer pairs has been used to separate pathotypes of *Xac* or to differentiate strains in

the same pathotype. The rep-PCR technique also allows to evaluate the diversity of *Xac* in certain geographic areas of the world (Cubero & Graham 2002).

In this study, we examined the pathogenicity of *Xac* strains from Taiwan on the leaves of Mexican lime, grapefruit, Liucheng, and lemon. We found both of the strains could induce atypical symptoms and further characterized these strains based on their physiological, biochemical, genetic, and proteinic characterizations. The results revealed that these atypical symptoms-inducing strains are novel strains of *Xac*.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIA STRAINS AND CULTURE CONDITION

A total of six *X. axonopodis* strains were used in this study, including two typical Asiatic type strains XW19 and 2863 (*Xac*-A), one atypical symptoms-inducing strains XW47 (*Xac*-A^f type), one citrus bacterial spot (CBS) strain *X. axonopodis* pv. *citrumelo* F2 (pathotype E) (Lin *et al.* 2005), and newly isolated strains *X. axonopodis* pv. *citri* XL16 and XL38 from Taiwan. All strains were stored in YPD broth (yeast extract 7 g, bactopeptone 7 g, dextrose 7g, distilled water 1000 mL, pH 7.2) (Verniere *et al.* 1991) cotaining 20% glycerol at -80℃. When required, each bacterial strain was streaked out from the glycerol stock at -80℃ and cultured on YPD agar plates at 30℃ for 3 days.

PATHOGENICITY TEST

Citrus plants (*C. paradisi*, grapefruit; *C. aurantifolia*, Mexican lime; *C. sinensis*, Liucheng; *C. limon*, lemon) grown in pots under greenhouse conditions were used for examining the pathogenicity of *X. axonopodis* pv. *citri* strains. To prepare inoculum, bacterial cells grown overnight in YPD broth were harvested by centrifugation and resuspended in sterile distilled water to a concentration of approximately 10^8 colony-forming units (CFU)/mL. Prior to inoculation, six wounds per 1-cm^2 on young fully expanded citrus leaves were made with a standard 26-gauge needle. An aliquot (20 μL) of bacterial suspension was dropped onto each of six wounds on leaves, and the inoculum drops were wiped off with sterile cotton just after inoculation. Citrus plants inoculated with various *X. axonopodis* strains were moved into a growth chamber with 65–90% relative humidity and 12-hr light at 30℃ and 12-hr dark at 25℃. Visual symptom was recorded and examined with dissection microscopy.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Physiological and biochemical characteristics used to differentiate pathovars of *X. axonopodis* associated with citrus plants were performed to characterize the *X. axonopodis* pv. *citri* strains isolated in Taiwan. Salt tolerance was tested by growing bacteria on YPDA plates containing 3% NaCl (Verniere *et al.* 1998). Hydrolysis of gelatin was performed as described in Lelliott *et al.* (Lelliott *et al.* 1966). Oxidation of carbon sources was carried out on Biolog® GN microplates (Biolog Inc., Hayward, CA) as described by Verniere *et al.* (Verniere *et al.* 1993). Pectolytic activity was tested on Hildebrand's medium with pH values at 5.0, 7.0, and 8.5 (Hildebrand 1971).

TOTAL DNA EXTRACTION

Total DNAs of xanthomonad strains were extracted using the method described by Sambrook *et al.* (1989). PCR was performed with a thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, CT).

IDENTIFICATION OF *Xanthomonas* STRAINS WITH SPECIFIC PRIMER PAIRS

Primer pairs 2/3 and 4/7 designed from sequence of plasmid of the *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung *et al*. 1993), and primer pairs *J-pth1/J-pth2*, *J-RXg/J-RXc2* designed based on sequences of nuclear localization signal in *pthA* (Cubero & Graham 2002) and rDNA (Cubero & Graham 2002) of *X. axonopodis* pv. *citri* were used to identify or differentiate the *Xac* strains tested in this study.

REP- AND ERIC-PCR ANALYSES

The genetic diversity among the *Xac* strains was analyzed by REP- and ERIC-PCR. The REP-PCR was carried out as described by Versalovic *et al.* (Versalovic *et al*. 1991) with some modifications. A 25 μL reaction mixture contained 150 ng template DNA, 1× *Taq* buffer, 3 mM $MgCl_2$, 1.25 μM each of primers REP1-1 and REP2-1, 250 μM each of deoxynucleoside triphosphates and 0.8 U Taq polymerase (DyNAzyme^{TM} II DNA Polymerase, Finnzymes Oy Inc. Finland). The amplification condition consisted of 94℃ for 1 min, 44℃ for 1 min, and 65℃ for 8 mins for 30 cycles plus an initial step of 95℃ for 7 mins and a final step of 65℃ for 15 mins. The ERIC-PCR was carried out with primer pair ERIC1R/ERIC2 in a 25 μL reaction mixtures in which the other ingredients were the same as that for REP-PCR; the amplification condition consisted of 94℃ for 1 min, 52℃ for 1 min, and 65℃ for 8 mins for 30 cycles plus an initial step of 95℃ for 7 mins and a final step of 65℃ for 15 mins. PCR products of the REP- and ERIC-PCR were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in 0.5× TAE buffer at 90 V for 4 hrs and were stained with ethidium bromide. REP- and ERIC-PCR fingerprint profiles were converted to binary form (0 = absence; 1 = presence), and Dice coefficient was calculated to determine the similarity among the bacterial strains tested (Dice 1945).

PATHOGENICITY (*pthA*) GENE DETECTION

The primers pthAP7/AR2 described Lin *et al.* (2005) were used to amplify the region corresponding to nucleotide of *pthA*. Polymerase chain reaction for *pthA* gene was performed in a 50 μL mixtures containing 150 ng template DNA, 1× Taq buffer, 1 μM primer pthAP7, 1 μM primer pthAR2, each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 300 μM, 1U of Taq plus DNA polymerase, and 5 μL DMSO. The amplification condition consisted of 94℃ for 1 min, 63℃ for 1 min, and 72℃ for 5 mins for 35 cycles plus an initial step of 94℃ for 10 mins and a final step of 72℃ for 10 mins.

SDS-PAGE ANALYSIS

Electrophoresis of cellular proteins was carried out in a discontinuous system under the denaturing condition following the method of Laemmli (Laemmli 1970). A bacterial suspension with an optical density of 1.0 at 630 nm was prepared in 1 mL distilled water in an Eppendorf tube from each strain cultured on nutrient agar medium cantaining 1% glucose. Each sample was spun down at 1000 rpm for 5 mins at 4℃. The bacterial pellet was washed in sterile distilled water and then resuspended in sample

buffer at 0.2× volume, boiled for 4 mins and centrifuged at 10000 rpm for 10 mins. Fifty microliters of soluble proteins from each sample was loaded into slots of stacking gel (5% w/v). Proteins were fractioned in 12% resolving gel. Electrophoresis was carried out in a vertical gel slab unit (Sigma Chemical Co., London, UK) at a constant voltage of 140 V untile the tracking dye reached near the bottom. Gel was stained in Coomassie brilliant blue R250 and destained in acetic acid: methanol solution without the dye.

RESULTS

PATHOGENICITY TEST

Based on the symptoms induced on leaves of the four *Citrus* species, the strains XL16 and XL38 tested were grouped into *Xac*-A^p type (Table 1). In the *Xac*-A^p type strains induced flat necrotic lesions with watersoaked margins and light chlorotic haloes on the leaves of Mexican lime (Fig. 1C), grapefruit (Fig. 1F), Liucheng and lemon. The size of lesions induced by strains XL16 and XL38 on leaves of four citrus species was not significantly different from that induced by XW19. The lesion size was in a range from 1.9 to 2.6 mm in diameter 24 days after inoculation.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZACTION

Type *Xac*-A^p strains XL16 and XL38 were able to grow in the presence of 3% NaCl, possessed hydrolysis ability of gelatin and were positive in utilization of L-fucose, D-galactose and alaninamide in the Biolog® GN plate. They also were positive for pectolytic activity on Hildebrand's medium at pH 7.0 and pH 8.5 the same as reference strains of types *Xac*-A and *Xac*-A^f (Table 2), whereas *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (pathotype E) strain F2 did not utilize L-fucose and with no pectolytic activity on the Hildebrand's medium at various pH values (Table 2).

IDENTIFICATION OF *Xanthomonas* STRAINS WITH SPECIFIC PRIMER PAIRS

Xac-specific primers 2/3, 4/7, *J-pth1*/*J-pth2* and *J-RXg*/*J-RXc2* were used to identify strains XL16 and XL 38. Specific PCR products were detected from these two strains as well as reference strains of *Xac*-A 19 and 2863. No specific amplified product was detected from DNA of *X. axonopodis* pv. *citrumelo* F2 with these primer pairs (Table 2).

REP- AND ERIC-PCR ANALYSES

The similarity coefficient of both atypical symptoms-inducing strains XL16 and XL38 was 0.9–1.0 to *Xac* reference strains XW19 or 2863 based on REP- and ERIC-PCR analyses (Fig. 2). The size of amplification products ranged from 800 to 2500 base pairs (bp) for ERIC and from 600 to 2000 bp for REP.

PATHOGENICITY (*pthA*) GENE DETECTION

A 3.8 kb DNA product containing a full length of *pthA* gene of *Xac* strain was amplified with primer pair pthAP7/pthAR2 from each of *Xac* strains XL16, XL38 and XW19 but not from *X. axonopodis* pv. *citrumelo* strain F2. (Fig. 3).

SDS-PAGE ANALYSIS OF TOTAL SOLUBLE PROTEINS

The reproducibility of the electrophoresis technique used in this study was checked by preparing protein extracts in duplicate and running all of the extracts in at least two gels. In all cases, a level of reproducibility of more than 0.9 was obtained. A high homogeneity in SDS protein profiles was observed among *Xac* strains XL16, XL38, XW47, and XW19 and there were no detectable differences among these strains tested (Fig. 4).

Table 1. Symptoms induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains on four *Citrus* species

Type	Strains	*C. aurantifolii* (Mexican lime)	*C. paradisi* (Grapefruit)	*C. sinensis* (Liucheng)	*C. limon* (Lemon)
A	XW19	Canker [z]	Canker	Canker	Canker
A^f	XW47	Canker	FW	FW	FW
A^p	XL16,XL38	FW	FW	FW	FW

[z] Canker: Typical erumpent canker lesion with watersoaked margin and light chlorotic halo; FW: Flat necrotic lesion with watersoaked margin and light chlorotic halo.

Table 2. Physiological, biochemical and genetic characteristics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* type A^p strains XL16 and XL38

Item	XL16	XL38	XW47	XW19 [w]	2863	F2
Growth on NaCl (3%)	+ [v]	+	+	+	+	+
Hydrolysis of gelatin	+	+	+	+	+	+
Oxidation of carbon sources [z]						
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
Alaninamide	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	+	+	+	+	+	—
Pectolytic activity on [y]						
Hildebrand's medium (pH5.0)	—	—	—	—	—	—
Hildebrand's medium (pH7.0)	+	+	+	+	+	—
Hildebrand's medium (pH8.5)	+	+	+	+	+	—
PCR with primers [x]						
2/3	+	+	+	+	+	—
4/7	+	+	+	+	+	—
J-pth1/*J-pth2*	+	+	+	+	+	—
J-RXg/*J-RXc2*	+	+	+	+	+	—

[z] Oxidation of carbon sources was done in the Biolog GN plates as described by Verniere *et al*. (1993).
[y] Pectolytic activity was tested on Hildebrand's medium (Hildebrand 1971).
[x] The primer pairs 2/3 and 4/7 are specific for DNA fragments in the *X. axonopodis* pv. *citri* plasmid (Hartung *et al*. 1993); The primer pair *J-pth1*/*J-pth2* is specific for the nuclear localization signal in *pthA* of *X. axonopodis* pv. *citri* (Cubero & Graham 2002); The primer pair *J-RXg*/*J-RXc2* is specific for rDNA of *X. axonopodis* pv. *citri* (Cubero & Graham 2002).
[w] Strains XW19 and 2863 were reference strains of type *Xac*-A for *X. axonopodis* pv. *citri*; XW47 was a reference strain of type *Xac*-A^f for *X. axonopodis* pv. *citri* ; F2 was a reference strain for *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (pathotype E).
[v] ＋: positive reaction; －: negative reaction.

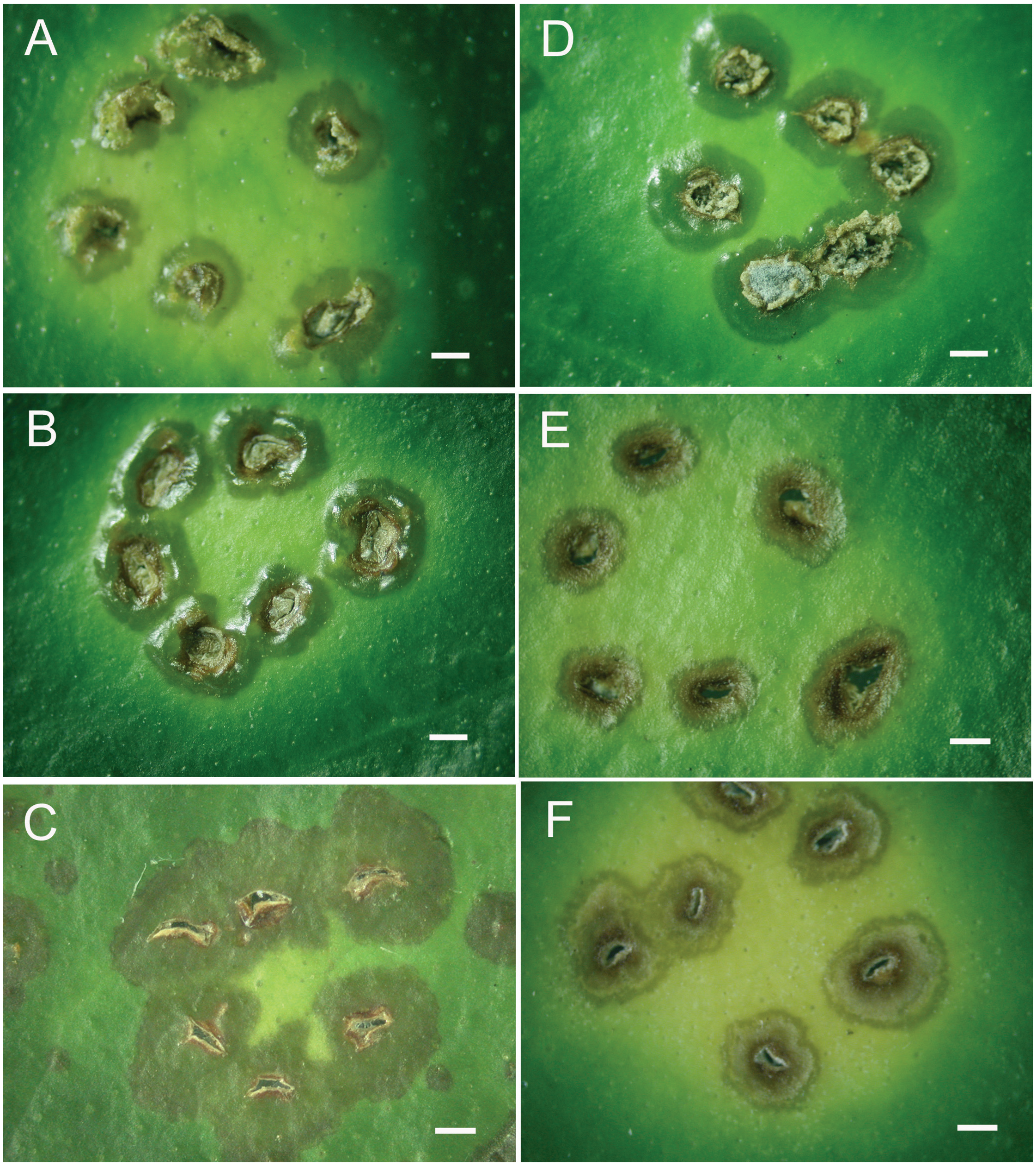

Fig. 1. Symptoms induced on leaves of Mexican lime (A, B, C) and grapefruit (D, E, F) by strains of *X. axonopodis* pv. *citri* 24 days after inoculation. (A and D): Typical erumpent canker lesions with watersoaked margin and light chlorotic halo induced by type *Xac*-A strain XW19; (B): Typical erumpent canker lesions with watersoaked margin and light chlorotic halo induced by type *Xac*-A^f strain XW47; (E): Flat necrosis lesions with watersoaked margin and light chlorotic halo induced by type *Xac*-A^f strain XW47; (C and F): Flat necrosis lesions with watersoaked margin and light chlorotic halo induced by type *Xac*-A^p strain XL38. (Bars = 1 mm).

DISCUSSION

According to symptoms induced by *Xac* on leaves of four *Citrus* species, we found type *Xac*-A^p strains XL16 and XL38 failed to induce any erumpent canker lesions typical of *Xac*-A on the leaves of Mexican lime, grapefruit, Liucheng, and lemon but they induced flat necrotic with watersoaked lesions on the leaves of four *Citrus* species. Symptom induced by type *Xac*-A^p strains on the leaves of Mexican lime were different from those induced by strains of types *Xac*-A, *Xac*-A^f, *Xac*-A^r, *Xac*-A*, and *Xac*-A^w (Verniere *et al*. 1998; Sun *et al*. 2004; Lin *et al*. 2005). To our knowledge, there is no any other *Xac* strain which is pathologically similar to strains of type *Xac*-A^p.

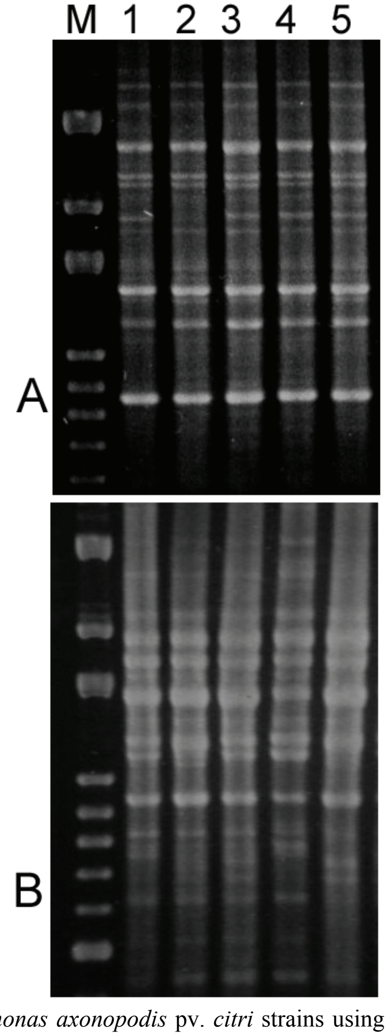

Fig. 2. Rep-PCR patterns of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains using ERIC- (A) and REP- primer pair (B). Lanes 1-5: DNA templates from stains XL16, XL38, XW47, XW19 and 2863, respectively; lane M: Bio 100 DNA ladder.

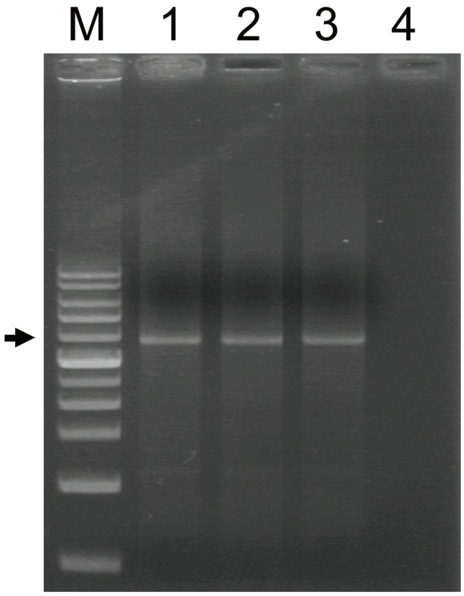

Fig. 3. Amplification profiles of DNAs from *Xanthomonas axonopodis* strains by polymerase chain reaction with primer pair pthAP7/pthAR2 (A). Lanes 1-3: *X. axonopodis* pv. *citri* strains XL16, XL38 and XW19, respectively; lane 4: *X. axonopodis* pv. *citrumelo* F2; lane M: Gen-KB DNA ladder. The predicted 3.8 kb DNA fragment containinng an entire length of *pthA* gene is marked with an arrow in the margin.

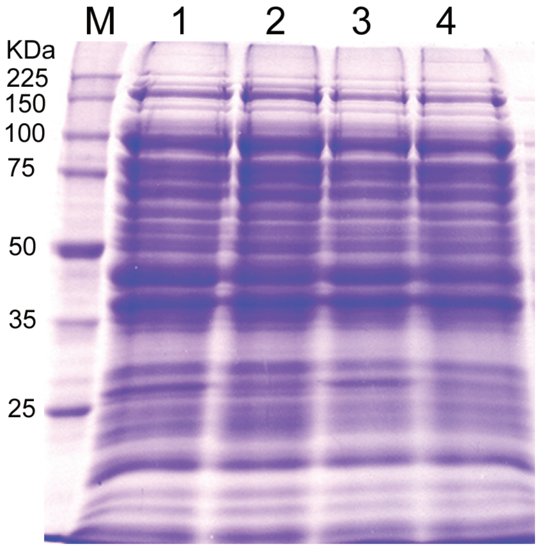

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of total soluble proteins from different strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lanes 1-4: *X. axonopodis* pv. *citri* strains XL16, XL38, XW47 and XW19, respectively; lane M: the protein molecular weight markers.

In physiological and biochemical tests, the atypical symptoms-inducing strains of type *Xac*-A^p could be grown on 3% NaCl, hydrolyze gelatin and utilize L-fucose, D-galactose and alaninamide. These strains shared typical *Xac* group profiles of assimilation of these three carbon sources as reported by Verniere *et al. (*1993). This study also showed that the reference strain *X. axonopodis* pv. *citrumelo* F2, a CBS strain, could utilize D-galactose and alaninamide but not L-fucose. Therefor, type *Xac*-A^p could be differentiated from *X. axonopodis* pv. *citrumelo* by the carbon source utilization (Table 2).

Similarity coefficients obtained from REP- and ERIC-PCR analyses grouped *Xac*-A^p strains XL16 and XL38 with the reference strains of types *Xac*-A and *Xac*-A^f into the same group. REP- and ERIC-PCR analyses did not display any major difference among the *Xac* strains used in this investigation (Fig. 2). Specific primers have been designed to identify or differentiate of *Xanthomonas* spp. associated with citrus plant (Hartung *et al*. 1993; Cubero & Graham 2002). In this study, strains in *Xac*-A^p could be identified as *Xac* with primer pairs 2/3, 4/7, *J-pth1/J-pth2*, *J-RXg/J-RXc2*, and pthAP7/pthAR2. However, strain F2 can not be detected with these primer pairs. Thus, these primer pairs could be used to differentiate *Xac*-A^p strains from *X. axonopodis* pv. *citrumelo* strain. Strains of *Xac*-A^w can not be detected with primer pairs 2/3 (Cubero & Graham 2002) and 4/7 (Sun *et al*. 2004), and a distinct DNA profiles could be amplified from *Xac*-A* strains with primer pair pthAP7/pthAR2 (Lin *et al*. 2005). Thus, the primer pairs 2/3, 4/7 and pthAP7/pthAR2 could be used to differentiate type *Xac*-A^p strains from types *Xac*-A^w or *Xac*-A* strains.

Sequences of *lrp* gene have been used to characterize the relationship among strains in different pathovars of *X. axonopodis* and other *Xanthomonas* species (Cubero & Graham 2004). Based on the *lrp* gene sequences, atypical symptoms-inducing strains XL16 and XL38 in type *Xac*-A^p were grouped into the same cluster with typical symptoms-inducing strains XW19 and 2863 in type *Xac*-A (unpublished data).

A pathogenicity gene, *pthA*, is required, and present in all *X. axonopodis* strains tested causing citrus canker disease, and absent in non-canker causing xanthomonds isolated from citrus. The result suggested that the presence or absence of a *pthA* allele is therefore diagnostic for strains having capacity to cause erumpent canker lesions on citrus. Althought *Xac*-A^p type strains XL16 and XL38 induced flated necrotic lesions with watersoaked margin on the leaves of four *Citrus* species, a 3.8 kb DNA fragment containing entire *pthA* gene was amplified from total DNAs of type *Xac*-A^p strains XL16 and XL38 with primer pair pthAP7/pthAR2. It has been shown that for *avrBs3* family of avirulence gene, which includes *pthA* from *Xac* (Swarup *et al*. 1991; Swarup *et al*. 1992; AI-Saadi *et al*. 2007) that the central region of such *avr* genes is composed of a number of 102 bp direct repeats are key factors determining the interaction with plant resistance genes (Bonas *et al*. 1993). Novel host specificities have been reported based on *pthA* constructs engineered with altered numbers of 102 bp repeats (Yang & Gabriel 1995). Thus, such a rearrangement, occurring spontaneously in a variant clonal subgroup of *Xac*, could account for the origin of *Xac*-A^p group of strains. The studies on the mechanism of atypical symptoms-inducing between *Xac*-A^p strains with citrus plants have been undertaken.

In the pathogenicity tests, we found new strains in type *Xac*-A^p which induced atypical symptoms on leaves of *Citrus* species tested. Based on physiological, biochemical, genetic and proteinic analyses, strains of type *Xac*-A^p were characterized as *Xac*. Type *Xac*-A^p strains could be differentiated from strains of type *Xac*-A^f, *Xac*-A* and *Xac*-A^w by a distinct pathogenicity on the leaves of Mexican lime. Moreover, *Xac*-A^p can also be differentiated from a pathologically similar strain *X. axonopodis* pv. *citrumelo* by oxidation of carbon sources, pectolytic activity and amplified DNA profiles of PCR with specific primer pair for *Xac*.

引用文獻 (Literature cited)

AI-Saadi, A., J. D. Reddy, Y. P. Duan, A. M. Brunings, Q. Yuan, and D. W. Gaberiel. 2007. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 934-943.

Alvarez, A. M., A. A. Benedict, C. Y. Mizumoto, L. W. Pollard, and E. L. Civerolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with monoclonal antibodies. Phytopathology 81:857-865.

Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo. 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. Mol. Gen. Genet. 238:261-269.

Civerolo, E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. J. Rio Grande Valley Hortic. Soc. 37:127-145.

Civerolo, E. L. and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunoabsorbent assay. Plant Dis. 66:231-236.

Cubero, J. and J. H. Graham. 2002. Genetic relationship among world-wide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68:1257-1264.

Cubero, J. and J. H. Graham. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (*lrp*) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:429-437.

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecol. 26:297-302.

Graham, J. H. and T. R. Gottwald. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial canker diseases in Florida. Plant Dis. 75:1193-1200.

Graham, J. H., J. S. Hartung, R. E. Stall, and A. R. Chase. 1990. Pathological, restriction-fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. Phytopathology 80:829-836.

Hartung, J. S. and E. L. Civerolo. 1989. Restriction fragment length polymorphism distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. Phytopathology 79:793-799.

Hartung, J. S., J. F. Daniel, and O. P. Pruvost. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. Appl. Environ. Microbiol. 59:1143-1148.

Hildebrand, D. C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. Phytopathology 12:1430-1436.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lelliott, R. A., E. Billing, and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J. Appl. Bacteriol. 29:470-489.

Lin, H. C., S. T. Hsu, A. S. Hwang, and K. C. Tzeng. 2005. Phenotypic and genetic characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains inducing atypical symptoms on citrus leaves in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:227-238.

Mohammadi, M., M. R. Mirzaee, and H. Rahimian. 2001. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. J. Phytopathol. 149:65-75.

Pruvost, O., J. S. Hartung, E. L. Civerolo, C. Dubois, and X. Perrier. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomans campestris* pv. *citri*, the cause agent of citrus bacterial canker disease. Phytopathology 82:485-490.

Sambrook, J., T. I. Maniatis, and E. F. Fritsch. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y. 581 pp.

Schubert, T. S., S. A. Rizvi, X. Sun, T. R. Gottwald, J. H. Graham, and W. N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. Plant Dis. 85:340-356.

Stall, R. E. and E. Civerolo. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. Annu. Rev. Phytopathol. 29:339-420.

Sun, X., R. E. Stall, J. B. Jones, J. Cubero, T. R. Gottwald, J. H. Graham, W. N. Dixon, T. S. Schubert, P. H. Chaloux, V. K. Stromberg, G. H. Lacy, and B. D. Sutton. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Dis. 88:1179-1188.

Swarup, S., R. de Feyter, R. H. Brlansky, and D. W. Gaberiel. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.

Swarup, S., Y. M. T. Kingsley, and D. W. Gaberiel. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:204-213.

Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:472-489.

Vauterin, L., P. Yang, B. Hoste, M. Vancanneyt, E. L. Civerolo, J. Swings, and K. Kersters. 1991. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA-DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:535-542.

Verniere, C., M. Devaux, O. Pruvost, A. Couteau, and J. Luisetti. 1991. Studies on the biochemical and physiological variations among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. Fruits 46:162-170.

Verniere, C., O. P. Pruvost, E. L. Civerolo, O. Gambin, J. P. Jacquemoud-Collet, and J. Luisetti. 1993. Evaluation of the biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Appl. Environ. Microbiol. 59:243-249.

Verniere, C., J. S. Hartung, O. P. Pruvost, E. L. Civerolo, A. M. Alvarez, P. Maestri, and J. Luisetti. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. Eur. J. Plant Pathol. 104:477-487.

Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823-6831.

Yang, Y. and D. W. Gabriel. 1995. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. J. Bacteriol 177:4963-4968.

台灣柑橘潰瘍病菌新菌株之特性分析 [1]

林信成[2,5] 張翔[3] 曾國欽[4]

摘 要

林信成、張翔、曾國欽。2008。台灣柑橘潰瘍病菌新菌株之特性分析。台灣農業研究 57:265–278。

將台灣柑橘植株所分離到之柑橘潰瘍病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) 菌株，在墨西哥萊姆 (*Citrus aurantifolia*)、葡萄柚 (*C. paradisi*)、柳橙 (*C. sinensis*) 及檸檬 (*C. limon*) 等四種不同品種之柑橘植株葉片上分別測試其病原性。測試結果顯示這些菌株中有兩株菌株可在測試之四種柑橘植株葉片上，引起具水浸狀邊緣之扁平壞疽病斑。依據耐鹽性、明膠水解作用、碳素源利用、應用柑橘潰瘍病菌專一性引子對之聚合酵素連鎖反應、重複性序列聚合酵素連鎖反應及十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 分析等生理、生化、基因及蛋白質特性分析，顯示這兩株菌株係屬於 *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*)，並將歸類為 *Xac*-A^{p} 類型菌株。利用碳素源利用、明膠水解作用及 pthAP7/pthAR2、2/3、4/7、*J-pth1*/*J-pth2*、*J-RXg*/*J-RXc2* 等引子對之聚合酵素連鎖反應的 DNA 圖譜，可將這兩株菌株與 *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (E 病原型) 菌株區分開；然而僅能利用在墨西哥萊姆上之病原性差異將這些菌株與 *Xac*-A^{f} 類型菌株區分開。數據顯示出由台灣分離到可引起非典型病徵之菌株為 *X. axonopodis* pv. *citri* 之新特殊菌株，並將其命名為 *Xac*-A^{p} 以有別於 *Xac*-A，*Xac*-A^{f}，*Xac*-A^{r}，*Xac*-A*及 *Xac*-A^{w} 等類型菌株。

關鍵詞：柑橘潰瘍病、*pthA* 基因、重複性序列聚合酵素連鎖反應、聚丙烯醯胺膠體電泳、柑橘潰瘍病菌。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2335 號。接受日期 97 年 11 月 5 日。
2. 私立中州技術學院生物技術系助理教授。台灣 彰化縣 員林鎮。
3. 本所生技組聘用高級研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 國立中興大學植物病理學系教授。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：lin1368@dragon.ccut.edu.tw；傳真：(04)8394070。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):279–294 (2008)

甘藷新品種台農73號之育成[1]

賴永昌[2,4] 李忠田[2] 鄭統隆[3] 蔡武雄[2]

摘　要

賴永昌、李忠田、鄭統隆、蔡武雄。2008。甘藷新品種台農 73 號之育成。台灣農業研究 57:279–294。

甘藷新品種台農 73 號於 89 年以清水紫心為母本，台農 62 號為父本，所產生之雜交後代，並於 90 年實生系後代中選拔而得到之優良品系 CYY90-C17。本品系在 91 年秋作第一年組 (初級試驗) 之塊根產量為每公頃 25,999 kg，較對照種台農 57 號增產 1.2%，92 年第二年組 (高級試驗) 之塊根產量為每公頃 29,334 kg，較對照種台農 57 號增產 21.1%；另外 94–95 年區域試驗之塊根產量平均為 33,899 kg，低於對照種台農 57 號。本品種塊根皮色為淡紅色，肉色為深紫色，富含 cyanidin 及 peonidin 等花青素，具抗氧化功用，且藷形整齊，食味佳，可作為鮮食用及烤藷等加工用途，為第一個台灣自行育成之紫肉甘藷品種，極具發展潛力，已於 96 年 3 月 16 日經審查通過，正式命名為甘藷台農 73 號。

關鍵詞：甘藷、產量比較試驗、區域試驗、花青素。

前　言

甘藷為台灣重要之雜糧作物，自日據時代起一直到 1973 年為止台灣甘藷除食用外，並為農村養豬之主要自給飼料，因為甘藷需求數量龐大，栽培面積平均維持在 20 至 24 萬餘公頃左右；但自 1973 年以後，甘藷飼料用途，逐漸被玉米取代，以致需求量銳減，造成栽培面積大幅度縮小。近年來甘藷主要用途為鮮食用，少部分作為澱粉及食品加工用原料，加上葉菜用甘藷新利用方式，甘藷再度為消費者喜愛，自 1989 年以後栽培面積維持在一萬公頃左右。近年來養生觀念之興起，甘藷含豐富之營養成分，成為良好之健康食品，因此栽培面積也逐漸增加。

台灣甘藷品種之改良工作，可分成三個不同時期，第一個時期 1895–1945 年，此時期之育種目標為豐產、高澱粉品種，主要用途是澱粉、釀酒、溶劑原料及飼料；第二個時期 1946–1960 年，主要育種目標為高澱粉及食用品種，產品作為飼料、澱粉及輔助食糧之用；第三個時期為 1961 年迄

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2336 號。接受日期：97 年 11 月 5 日。
2. 本所嘉義分所農藝系副研究員兼系主任、前助理及研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
3. 農業試驗所生技組副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：davidlai@dns.caes.gov.tw；傳真機：(05)2773630。

今，此一時期主要育種目標是重視甘藷、品種之品質，希望育成各種用途之優良品種，提高甘藷營養和使用價值，產品用途主要供食用，部分作爲食品加工和澱粉原料 (Li & Liao 1994)。

嘉義分所自 1911 年開始從事甘藷育種工作，先後育成台農 1 號至台農 72 號等 72 個甘藷品種，早期爲配合農村需求，育種目標以鮮食用及飼料用甘藷爲主要目標，近年來配合消費者需求轉變爲鮮食用及食品加工用；尤其在台灣加入國際貿易組織 (WTO) 後，提高甘藷產量與品質，研發擴大甘藷加工利用方式，增加甘藷產品多樣性，迎接進口農產品的衝擊，作爲未來甘藷育種目標。

過去缺乏米食時代，窮苦人家常以甘藷替代米食，近年來甘藷之營養價值廣泛被醫學界及食品營養專家所肯定，選育具有高營養成分之甘藷品種一直是甘藷育種之主要目標。嘉義分所自 89 年秋作由雜交後裔中選出品系 CYY90-C17，經一定育種程序之試驗結果顯示，該品系之花青素含量高，藷形及食味佳，頗具有推廣價值，因此提出申請命名登記，並於 96 年 3 月 16 日經審查委員審查通過，正式命名爲甘藷台農 73 號 (商品名紫玉)，以迎合農民與消費者求新求變之需求。

材料與方法

實生系選拔

89 年度以甘藷地方品種 (清水紫心) 爲母本，台農 62 號爲父本雜交產生之種子，培育得實生系 352 株，90 年依據單株塊根產量、塊根乾物率、皮色、肉色及藷形等性狀之優劣，選拔適當之優良品系，進入品系產量比較試驗 (Li 1974, 1980)。

品系產量試驗

第一年組品系產量比較試驗：供試 56 品系，試驗採 8 × 8 簡方設計，以台農 57 號爲對照種，單行區，2 重複，行長 6 m，行株距 1 × 0.25 m，在嘉義分所水源地農場進行 ，採收時稱取小區莖葉重及塊根重，再換算成莖葉及塊根公頃產量。第二年組品系產量比較試驗：供試 8 品系，試驗設計採逢機完全區集設計 (RCBD)，以台農 57 號爲對照種，4 重複，行長 6 m，行株距 1 × 0.25 m，在嘉義分所水源地農場進行，採收時稱取小區莖葉重及塊根產量，再換算莖葉及塊根公頃產量 (Li 1957, 1962, 1967; Li 1971; Montgomery 1984)。

區域試驗

94 及 95 年秋作於雲林水林鄉、嘉義嘉義市、台南新化鎮及高雄岡山鎮等 4 個地點進行。供試品系爲 CYY90-05、CYY90-12、CYY90-17、TYY87-41、TYY87-51、TLSP-024 等 6 品系，對照種爲台農 57 號。試驗設計採逢機完全區集設計 (RCBD)，試區行長 6 m，單行區，重複 6 次，行株距 1 × 0.25 m，採收後稱取每小區莖葉及塊根重後，再換算莖葉及塊根公頃產量 (Li 1962, 1964, 1971; Montgomery 1984)。

穩定性分析

由雲林、嘉義、台南及高雄等 4 個區域試驗兩年所得之數據，以塊根產量進行穩定性分析 (Lu 1994)。

主要病蟲害抗性檢定

調查主要病蟲害包含：(1) 軟腐病：嘉義分所將新鮮塊根經以人工傷口接種培養在 PBA 48 h 之菌絲塊，每次五個塊根，重複二次。(2) 病毒病：嘉義分所以複合感染捲葉型等病毒病之有病接

穗，人工嫁接於供試品系 CYY90-C17 等各 10 株，經一個月後取供試株爲接穗，嫁接於指示植物 *Ipomoea setosa* (牽牛花)。(3) 簇葉病：於澎湖馬公罹病區以田間自然感染方式檢定。(4) 蟻象：於澎湖馬公田間自然感染檢定。

採收期對甘藷塊根產量之影響

試驗設計採裂區設計，採收期爲主試區，品種 (系) 爲副試區，試區 8 m，行株距 1 × 0.25 m，3 行區，4 重複，採收期爲種植後 120 天、150 天及 180 天採收，品種 (系) 爲 CYY90-C17 (台農 73 號) 及台農 57 號。採收後稱取每小區之莖葉及塊根重，再換算成公頃莖葉及塊根產量。同時調查塊根中符合商品規格化之比率，計算方式如下：

$$\text{符合商品規格比率 (\%)} = \frac{\text{塊根直徑寬 5.8－10 cm 及長度 10－22.5 cm 之鮮重}}{\text{塊根總鮮重}} \times 100\ \%\text{。}$$

肥料施用量對甘藷產量之影響

試驗採裂區設計，不同肥料爲主試區，品種 (系) 爲副試區，試區 8 m，行株距 1 × 0.25 m，3 行區，4 重複，肥料量分別爲每公頃 N：P：K = 30：30：90、60：30：180、120：30：360 kg，品種 (系) 爲 CYY90-C17 (台農 73 號) 及台農 57 號。莖葉及塊根產量：採收後稱取每小區之莖葉及塊根重，再換算成公頃莖葉及塊根產量。調查方法如採收期試驗中所述。

種植密度對甘藷塊根產量之影響

試驗設計採裂區設計，種植密度爲主試區，品種 (系) 爲副試區，試區 8 m，行株距 1 × 0.25 m，3 行區，4 重複，種植密度分別爲每公頃種植 50,000、40,000、33,333 及 25,000 株，品種 (系) 爲 CYY90-C17 (台農 73 號) 及台農 57 號。調查項目如同採收期試驗之調查項目。

塊根化學組成分分析

將品系 CYY90-C17 (台農 73 號) 及台農 57 號提供食品工業研究所進行分析，分析項目有粗纖維、膳食纖維、還原糖、澱粉、胡蘿蔔素、維生素 C、鈣、磷等。

CYY90-C17 塊根花青素含量分析

試驗材料：紫皮-CYY90-C17 (台農 73 號)，黃皮-台農 57 號。將藷皮及藷肉分開，並分爲新鮮及乾燥的材料，比較其含量上之差異。

分析方法：以 1 % 酸化甲醇萃取，萃取液 0.8 N HCl 酸化後置於 100℃下 40 min，再將萃取液濃縮至乾，最後以 1 % 酸化甲醇回溶。在 HPLC (Waters 2695, Waters 2996) 分析條件方面，移動相爲 69 % water：10% acetic acid：21% methanol，流速 1 mL/min，分析管柱爲 ODS column (Inertsil ODS -3 column, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Precolumn: Inertsil ODS -3 column, 4.6 × 33 mm, 5 μm) (Bridle & Timberlake 1997; Teow e*t al*. 2007)。

結　　果

實生系選拔

89 年度以甘藷地方品種 (清水紫心) 爲母本，台農 62 號爲父本雜交產生之種子，培育得實生系 352 株，90 年根據單株塊根產量、塊根乾物率、皮色、肉色、形狀等特性優劣，選得優良品系 5

株，CYY90-C17 品系塊根數目為 4 個，單株塊根鮮重 1.5 kg，塊根乾物率 33.2%，塊根乾物粗蛋白質含量 2.94%，可溶性糖含量 10.01%，和澱粉含量 73.12%，皮色及肉色分別為紅色及紫色，且食味、品質佳，符合甘藷品系選拔條件，獲選進入品系產量比較試驗 (表 1)。

品系產量試驗

第一年試驗：本試驗採用簡方設計，試區行長 6 m，行距 1 m，株距 25 cm，單行區，重複 2 次，在嘉義分所水源地農場進行，種植期為 90 年 9 月 11 日，採收期為 91 年 2 月 17 日。採收後秤取每小區 32 株之莖葉產量及塊根產量後，再換算成每公頃莖葉及塊根產量，其試驗結果 CYY90-C17 每公頃平均鮮塊根產量達 25,999 kg，比對照種台農 57 號增產 1.3% (表 2)。

第二年試驗：試區採用逢機完全區集設計，小區行長 6 m，行距 1 m，株距 25 cm，單行區，重複 4 次，在嘉義分所水源地農場進行，種植期為 91 年 8 月 30 日，採收期為 92 年 2 月 17 日，其試驗結果為 CYY90-C17 之塊根產量為每公頃 29,334 kg，較對照種 57 號增產 21.1% (表 3)。

表 1. 甘藷五新選拔實生系之塊根產量等農藝性狀比較

Table1. The agronomic traits of five selected lines of sweet potato [z]

Sweet potato	Root-tuber yield (g/plant)	Dry matter (%)	Crude protein (%)	Crude starch (%)	Soluble sugar (%)	Skin color	Flesh color
CYY90-C17	1.50	33.2	2.94	73.12	10.01	Pinkish red	Dark purple
CYY90-C03	1.25	34.8	2.82	75.87	6.72	Red	Purple
CYY90-C29	1.20	30.3	2.40	71.94	12.07	Red	Purple
CYY90-C52	2.10	29.8	4.73	70.29	11.45	Red	Purple
CYY90-C72	1.50	29.2	4.15	69.32	9.29	Red	Purple
TNG 57 (cv.)	0.75	34.3	3.43	73.55	7.99	Yellow	Yellow
LSD(5%)	0.27						

[z] Planting date: September 13, 2000; Harvest date: March 12, 2001.

表 2. CYY90-C17 第一年組塊根產量及農藝性狀比較

Table 2. Tuber and agronomic traits of sweet potato lines CYY90-C17 in the preliminary field trial in 2001 [z]

Sweet potato	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield (kg/ha)	Index [y] (%)	Dry matter [x] (%)	Dry root			Skin color	Flesh color
					Crude protein (%)	Crude starch (%)	Soluble sugar (%)		
CYY90-C17 (line)	15,999	25,999	101.3	29.3	3.04	10.26	73.27	Pinkish red	Dark purple
TNG 57 (cv.)	13,333	25,965	100.0	31.8	3.13	11.25	76.35	Yellow	Yellow
LSD (5%)	2,254	2,170							

[z] Planting date: September 11, 2001; Harvest date: February 17, 2002.
[y] Index: the yield of test line/the yield of check × 100%.
[x] Dry matter: the dry matter of 100 g fresh root.

區域試驗

新品系於 94 及 95 年進行兩年秋作區域試驗，採逢機完全區集設計，小區面積行長 8 m，行株距 1 × 0.25 m，單行區，每小區種植 32 株先端苗，重複 6 次，試驗地點計有雲林縣水林鄉、嘉義市、台南縣新化鎮、高雄縣岡山鎮等四處，新品系 CYY90-C17 試驗結果如下：

94 年秋作 CYY90-C17 平均每公頃鮮塊根產量：水林地區為 45,009 kg，比對照種台農 57 號增產 11.1%，嘉義市為 32,173 kg，比對照種台農 57 號減產 15.4%，新化地區為 44,009 kg，比對照種台農 57 號減產 16.4%，岡山地區為 52,677 kg，比對照種台農 57 號減產 5.2%，綜合四處之平均 CYY90-C17 之塊根產量為 43,465 kg，比對照種台農 57 號減產 14.4% (表 4)。

表 3. CYY90-C17 第二年組品系塊根產量等農藝性狀比較

Table 3. Tuber and agronomic traits of sweet potato line CYY90-C17 in the advanced field trial in 2003 [z]

Sweet potato	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield (kg/ha)	Index[y] (%)	Dry matter [x] (%)	Dry root: Crude protein (%)	Dry root: Crude starch (%)	Dry root: Soluble sugar (%)	Skin color	Flesh color
CYY90-C17 (line)	11,111	29,334	121.1	36.7	3.08	9.45	77.12	Pinkish red	Dark purple
TNG 57 (cv.)	8,333	24,222	100.0	35.1	3.24	10.35	78.46	Yellow	Yellow
LSD (5%)	3,245	3,568							

[z] Planting date: August 30, 2002; Harvest date: February 17, 2003.
[y] Index: the yield of test line/the yield of check × 100%.
[x] Dry matter: the dry matter of 100 g fresh root.

表 4. 94 年期秋作區域試驗 CYY90-C17 品系塊根產量等性狀比較

Table 4. The agronomic traits of sweet potato line CYY90-C17 in the regional field trails in 2005

Location	Sweet potato	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	Dry root: Crude protein (%)	Dry root: Crude starch (%)	Dry root: Soluble sugar (%)
Yunlin	CYY90-C17 (line)	37,672	45,009	111.1	32.4	3.16	9.59	76.48
	TNG 57 (cv.)	39,341	40,508	100.0	29.7	3.21	10.47	76.24
	LSD (5%)	3,250	3,175					
Chiayi	CYY90-C17 (line)	35,007	32,173	84.6	31.0	2.96	10.85	75.23
	TNG 57 (cv.)	39,341	38,007	100.0	32.1	3.11	10.12	75.26
	LSD (5%)	4,326	4,624					
Tainan	CYY90-C17 (line)	60,512	44,009	63.6	30.7	2.71	9.15	74.32
	TNG 57 (cv.)	58,345	69,180	100.0	29.0	3.02	10.11	75.21
	LSD (5%)	2,175	5,241					
Kaohsiung	CYY90-C17 (line)	106,521	52,677	94.8	29.2	3.21	10.25	76.45
	TNG 57 (cv.)	122,857	55,511	100.0	27.9	3.24	9.31	78.25
	LSD (5%)	1,728	4,655					
Mean	CYY90-C17 (line)	59,928	43,465	85.6	30.8	3.01	9.96	75.62
	TNG 57 (cv.)	64,971	50,802	100.0	29.7	3.15	10.00	76.24
	LSD (5%)	4,415	3,179					

95 年秋作 CYY90-C17 平均每公頃鮮塊根產量：元長地區爲 32,500 kg，比對照種台農 57 號減產 19.6%，嘉義市爲 24,147 kg，比對照種台農 57 號減產 22.6%，新化地區爲 26,750 kg，比對照種減產 16.5%，岡山地區爲 27,750 kg，比對照種台農 57 號減產 30.0%，綜合四處之平均 CYY90-C17 之塊根產量爲 27,787 kg，比對照種台農 57 號減產 15.4% (表 5)。

綜合二年區域試驗四個地點綜合變方分析之結果如表 6：CYY90-C17 塊根平均每公頃產量爲 35,629 kg，較對照種台農 57 號減產 17.7%。而 CYY90-C17 在四個試驗地點經二年不同環境下，其塊根收量經穩定性分析結果顯示，CYY90-C17 之塊根產量平均爲每公頃 35,629 kg，穩定係數爲 1.36503，故該品系在不同年份及地區下爲高產且穩定之品系，顯示該品系在不同環境下皆能獲高塊根產量 (圖 1、表 6)。

主要病蟲害抗性檢定

各主要病蟲害檢定結果如表 7，其檢定結果說明如下 (表 7)：

軟腐病：嘉義分所將新鮮塊根經人工傷口接種培養在 PBA 48 h 之菌絲塊，每次 5 個塊根，重複 2 次，檢定結果發現 CYY90-C17 接種三天後外觀呈輕微受害症狀，五天後即完全腐爛，其耐病情形與台農 57 號及台農 66 號相似，皆呈感病性。

病毒病：嘉義分所以複合感染捲葉型等病毒病之有病接穗，人工嫁接於供試品系 CYY90-C17 等各 10 株，經一個月後取供試株爲接穗，嫁接於指示植物 *Ipomoea setosa* (牽牛花)， 經一個月後調查指示植物病徵，CYY90-C17 對黃斑型病毒、捲葉型及潛伏型病毒均呈感病性。

簇葉病：92 年夏作於澎湖馬公罹病區以田間自然感染方式檢定結果發現，本年度田間一般自然感染率低，CYY90-C17 及對照種皆未罹病。

表 5. 95 年期秋作區域試驗 CYY90-C17 品系塊根產量等性狀比較

Table 5. The agronomic traits of sweet potato line CYY90-C17 in the regional field trails in 2006

Location	Sweet potato	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	Dry root: Crude protein (%)	Dry root: Crude starch (%)	Dry root: Soluble sugar (%)
Yunlin	CYY90-C17 (line)	55,625	32,500	80.4	27.8	3.23	8.45	78.31
	TNG 57 (cv.)	58,750	40,416	100.0	27.6	3.41	9.26	77.32
	LSD (5%)	3,268	4,856					
Chiayi	CYY90-C17 (line)	38,958	24,147	77.3	28.4	3.02	9.54	76.22
	TNG 57 (cv.)	20,416	31,250	100.0	30.3	2.96	10.17	78.28
	LSD (5%)	3,567	4,524					
Tainan	CYY90-C17 (line)	59,375	26,750	83.5	25.5	3.17	10.24	75.34
	TNG 57 (cv.)	54,166	32,041	100.0	28.1	3.29	9.25	76.28
	LSD (5%)	5,026	5,178					
Kaohsiung	CYY90-C17 (line)	66,875	27,750	70.0	32.6	3.45	11.01	78.27
	TNG 57 (cv.)	78,083	39,625	100.0	33.9	2.99	9.58	77.35
	LSD (5%)	4,152	5,685					
Mean	CYY90-C17 (line)	55,208	27,787	77.6	28.6	3.22	9.81	77.04
	TNG 57 (cv.)	52,854	35,833	100.0	30.0	3.16	9.57	76.81
	LSD (5%)	2,127	4,154					

表 6. 94–95 年期秋作區域試驗甘藷品系塊根產量等性狀綜合比較

Table 6. Agronomic traits of six sweet potato lines in the regional trials of 2005 and 2006

Sweet potato	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	Dry of root: Crude protein (%)	Dry of root: Crude starch (%)	Dry of root: Soluble sugar (%)	Yield stability: Stability (b)	Yield stability: Standard error of b
CYY90-05	48,679	28,411	65.6	26.8	3.84	9.86	83.24	1.56872	0.32537
CYY90-12	54,734	33,234	76.7	31.2	3.64	10.98	83.55	-0.42867	0.32775
CYY90-C17	57,568	35,629	82.3	29.7	3.12	9.89	76.33	1.36503	0.23646
TYY87-41	65,642	41,119	94.9	27.7	4.25	10.53	87.43	2.02623	1.65751
TYY87-51	67,133	37,241	85.9	27.0	4.39	8.70	87.30	0.97399	0.89230
TLSP-024	54,192	32,321	74.6	30.3	4.35	10.83	81.60	0.39072	1.23033
TNG 57 (cv.)	58,913	43,317	100.0	29.9	3.16	9.79	76.53	1.10397	1.07673
LSD (5%)	4,250	5,240							

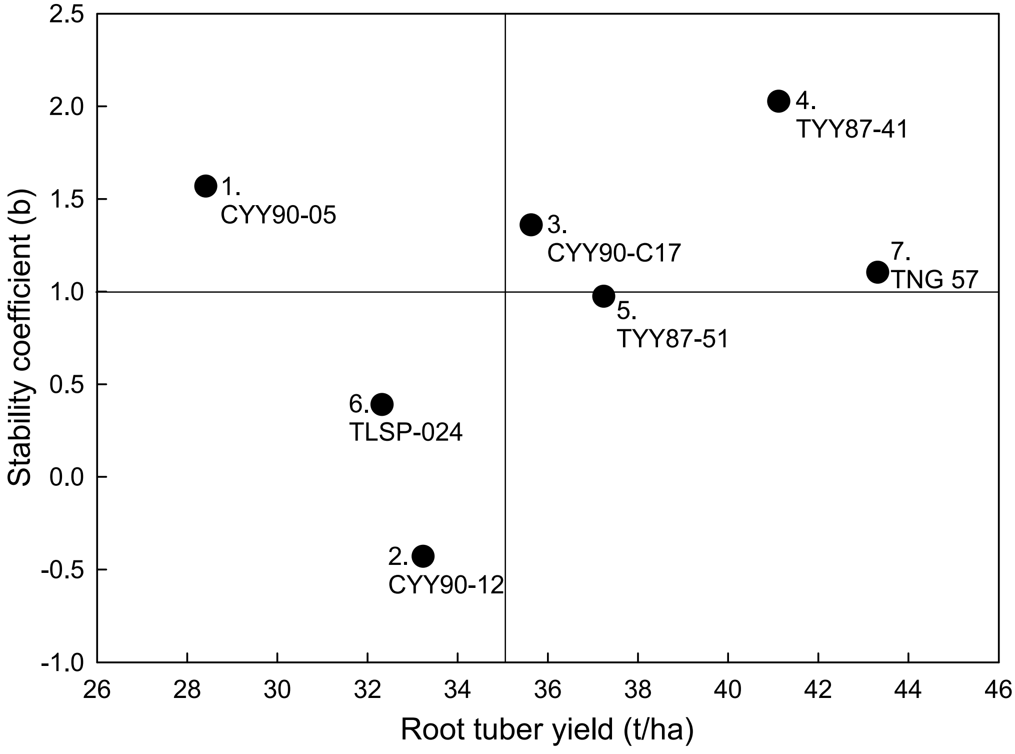

圖 1. 94–95 年甘藷區域試驗塊根產量一般穩定性。

Fig 1. Stability of root-tuber yield of sweet potato, six lines and one cultivar (control) in the regional trials of 2005 and 2006.

表 7. CYY90-C17 對主要病蟲害抗性檢定結果

Table 7. Reaction of sweet potato line CYY90-C17 to diseases[z] and insects

Sweet potato	*Rhizopus nigricans*	Virus			Mycoplasma-like organism (MLO) (%)	*Cylas formicarius* (Fabricius) (%)
		Leaf curl disease	Yellow spot disease	Latent infection disease		
CYY90-C17 (line)	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	0	42.4
TNG 57 (CK)	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	0	45.7
TNG 66 (CK)	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible	0	52.6
Red tail (CK)	–	–	–	–	0	30.5
Cropping season	Fall, 2004	Fall, 2004	Fall, 2004	Fall, 2004	Summer, 2003	Summer, 2003

[z] Resistance of diseases: 0% (High resistance), 0–5% (Resistance), 6–10% (Moderate resistance), 11–20% (Moderate susceptible), 21–30% (Susceptible), more than 31% (High susceptible).

蟻象：由 92 年夏作於澎湖馬公田間自然感染檢定結果，CYY90-C17 對螟蛾或受害率為 42.4%，較台農 66 號之 52.6%低，顯示 CYY90-C17 對蟻象有較佳之抗性表現。

採收期試驗

新品系 CYY90-C17 採收期試驗於 94 年 9 月 15 日秋作在嘉義分所試驗農場進行，試驗採裂區設計，以採收期為主試區，品種為副試區，試區行長 8 m，行距 1 m，株距 0.25 m，3 行區，4 重複，土壤質地為砂質壤土之試驗區，試驗結果顯示品系 CYY90-C17 在生育期 120 天後採收之每公頃塊根產量最低，而生育期 150 天及 180 天採收之塊根產量最高，且兩者間無顯著差異存在；而具商品規格比率之塊根產量亦以生育期 150 天及 180 天最高。而台農 57 號在生育期 120 天後採收之每公頃塊根產量最低，而具商品規格比率之塊根產量亦以生育期 150 天及 180 天最高 (表 8)。

肥料試驗

CYY90-C17 之肥料於試驗 94 年 9 月 15 日在嘉義分所試驗農場進行，試驗採裂區設計，不同肥料量為主試區，品種為副試區，試區行長 8 m，行距 1 m，株距為 0.25 m，3 行區，重複 4 次，土壤質地為砂質壤土之試驗區，試驗結果如表 9，CYY90-C17 之塊根產量以低肥區最低，而中肥區及高肥區之鮮塊根產量最高，且中肥區及高肥區間並無顯著差異存在，而具商品規格比率之塊根產量在 3 種肥料施用量間皆無顯著差異存在。而對照種台農 57 號之鮮塊根產量在 3 種施肥量間，以低肥區最低，而中肥區及高肥區之鮮塊根產量最高;而具商品規格比率之塊根產量在 3 種施肥量間皆無顯著差異存在。

種植密度試驗

種植密度試驗於 94 年 9 月 15 日在嘉義分所試驗農場進行，田間設計採裂區設計，以種植密度為主試區，品種為副試區，試區行長 8 m，行距 1 m，株距分別為 20、25、30 及 40 cm，每公頃種植株數分別為 50,000、40,000、33,333 及 25,000 株，3 行區，重複 4 次，土壤質地為砂質壤土之試驗田，試驗結果如表 10，CYY90-C17 之鮮塊根產量在每公頃 40,000 及 50,000 株最高，且兩種栽培密度間並無顯著差異存在，而 CYY90-C17 在 4 種栽培密度下之具商品規格比率之塊根產量皆無

顯著差異存在。而對照種台農 57 號在 4 種栽培密度下之鮮塊根產量在每公頃 40,000 及 50,000 株下最高，且 2 種栽培密度間並無顯著差異存在，而 CYY90-C17 在 4 種栽培密度下之塊根具商品規格比率之塊根產量皆無顯著差異存在。

表 8. 甘藷品系 CYY90-C17 不同採收期塊根產量等性狀比較

Table8. Effects of harvest date on the root-tuber yield and root contents of sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73) and TNG 57 (cv.) [z]

Sweet potato	Growth stage (day)	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield [y] (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	The ratio of commercial product [x] (%)	Dry root contents		
							Crude protein (%)	Crude starch (%)	Soluble sugar (%)
TNG 57 (cv.)	120	16,700	21,583 b	63.9	32.1	40.12	3.01	9.24	78.45
	150	18,500	31,750 a	94.1	29.8	62.10	2.95	10.21	79.20
	180	16,500	33,750 a	100.0	31.9	63.50	3.14	9.74	76.24
CYY90-C17 (line)	120	16,667	20,916 b	63.1	28.9	45.20	3.24	9.89	76.31
	150	19,500	30,000 a	90.5	30.5	70.80	3.08	9.12	75.22
	180	19,334	33,167 a	100.0	29.9	68.18	2.98	10.24	79.35

[z] Planting date: September 15, 2005; Harvest date: 120, 150 and 180 days after planting.
[y] Means in each column followed by different letters are different significantly at 5% level by LSD test.

[x] The ratio of comer product (%) = $\frac{\text{A}}{\text{Total root weight}} \times 100\ \%$.

A: The root weight of root diameter between 5.8–10 cm and root length between 10–22.5 cm.

表 9. 肥料施用量對甘藷品系 CYY90-C17 塊根產量等性狀影響

Table 9. Effects of fertilization on root-tuber yields and root content of sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73) and TNG 57 (cv.) [z]

Sweet potato	The amount of fertilization N:P:K (kg/ha)	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield [y] (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	The ratio of commercial product [x] (%)	Dry root contents		
							Crude protein (%)	Crude starch (%)	Soluble sugar (%)
TNG 57 (cv.)	30:30:90	19,166	22,917 b	67.4	30.2	61.42	3.06	9.12	78.09
	60:30:180	22,000	30,416 a	89.6	30.6	65.26	2.93	10.21	79.21
	120:30:360	21,250	34,000 a	100.0	31.4	66.17	2.99	9.65	79.56
CYY90-C17 (line)	30:30:90	17,500	22,083 b	77.3	30.5	65.20	3.16	8.98	77.10
	60:30:180	20,333	27,500 a	96.2	30.8	68.71	3.08	9.25	78.32
	120:30:360	21,167	28,583 a	100.0	31.9	70.28	2.89	10.05	79.25

[z] Planting date: September 15, 2005; Harvest date: February 17, 2006.
[y] Means in each column followed by different letters are different significantly at 5% level by LSD test.

[x] The ratio of comer product (%) = $\frac{\text{A}}{\text{Total root weight}} \times 100\ \%$.

A: The root weight of root diameter between 5.8–10 cm and root length between 10 –22.5 cm.

綜合 3 種栽培法試驗結果，品系 CYY90-C17 在種植後 150 天及 180 天採收可生產最高塊根產量及高具商品價值比率之塊根產量，而在中肥料及高肥料施用量可得最高塊根產量，種植密度為每公頃 40,000 及 50,000 株亦可生產最高之塊根產量，故在生產成本及高塊根產量之綜合考量下，品系 CYY90-C17 在種植 150 天後採收，中肥料施用量及種植密度為每公頃 40,000 株下，可獲得最高之塊根產量及具商品規格比率之塊根收量 (表 10)。

塊根化學組成分分析

於 94 年 4 月採收之 CYY90-C17 新鮮塊根，委託新竹食品工業發展研究所化學分析結果如下：CYY90-C17 還原醣、維生素 E 及鈣、磷皆較對照種台農 57 號高，其他化學成分則以台農 57 號較高 (表 11)。

表 10. 不同種植密度對甘藷品系 CYY 90-C17 塊根產量等性狀的影響

Table 10. Effect of planting density on root-tuber yield and root content of sweet potato, line CYY90-C17 (cv.TNG 73) [z]

Sweet potato	Planting density (plants/ha)	Shoot vine yield (kg/ha)	Root-tuber yield [y] (kg/ha)	Index (%)	Dry matter (%)	The ratio of commercial product [x] (%)	Dry of root contents: Crude protein (%)	Crude starch (%)	Soluble sugar (%)
TNG 57 (cv.)	25,000	14,833	20,833 b	73.9	31.3	65.20	2.89	9.32	78.25
	33,333	17,333	22,166 b	78.7	32.2	63.50	2.94	9.15	76.52
	40,000	19,833	28,166 a	100.0	29.7	62.31	3.05	10.06	77.27
	50,000	20,250	28,500 a	101.2	28.4	60.34	3.00	11.21	75.26
CYY90-C17 (line)	25,000	16,500	21,833 b	75.9	30.6	63.21	3.13	8.79	76.46
	33,333	19,000	26,667 ab	92.8	29.6	66.15	3.20	10.23	77.38
	40,000	19,833	28,750 a	100.0	30.8	68.20	2.79	10.08	76.43
	50,000	20,000	28,833 a	100.3	30.8	67.45	2.98	9.79	75.09

[z] Planting date: September 15, 2005; Harvest date: February 17, 2006.

[y] Means in each column followed by different letters are different significantly at 5% level by LSD test.

[x] The ratio of comer product (%) = $\frac{\text{A}}{\text{Total root weight}} \times 100\ \%$。

A: The root weight of root diameter between 5.8–10 cm and root length between 10–22.5 cm.

表 11. CYY90-C17 與台農 57 號新鮮塊根化學組成分分析比較

Table 11. Comparison of chemical components of sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73) and TNG 57 (cv.)

Sweet potato	Crude fiber (%)	Edible fiber (%)	Reducing sugar (%)	Starch (%)	Carotenoid (IU/100 g)	Vatamin C (mg/100 g)	Calcium (mg/100 g)	Phosphorus (mg/100 g)	Vatamin E (mg/100 g)
TNG 57 (cv.)	0.93	2.48	4.42	21.71	260.6	28.43	31.00	41.54	0.31
CYY90-C17 (line)	0.77	2.44	4.46	19.02	Non	19.60	66.96	61.31	0.44

CYY90-C17 塊根花青素含量分析

經由分析結果可知，紫色甘藷的花青素是由 cyanidin 及 peonidin 所組成。在新鮮藷皮之酸化 cyanidin 及 peonidin 之含量分別爲 53.2 及 72.2 μg/g FW，乾燥藷皮則分別爲 295.7 及 405.3 μg/g DW；而新鮮藷肉之酸化 cyanidin 及 peonidin 含量分別爲 3.2 及 6.8 μg/g FW，乾燥藷肉則爲 6.3 及 36.7 μg/g DW，顯示 CYY90-C17 之藷皮花青素含量高於藷肉。而黃色台農 57 號甘藷並無測到任何花青素的成分 (圖 2 及圖 3)。

CYY90-C17 外觀及食味品評比較

供試材料爲採收後一週，選用 200–300 g 重量的塊根切取中間部分，大小爲 2 × 2 × 5 cm，蒸煮 30 min 後，10 位無特殊口味及嗜好者進行官能品評，採用 Scheffe 對比試驗法進行，以台農 57 號爲對照種，品評結果如表 12。CYY90-C17 在形狀、皮色等外觀特性皆較台農 57 號優，而蒸煮後之肉色、質地、香氣、甜味及適口性亦均較台農 57 號爲佳，而肉質氧化褐變度低之特性亦較台農 57 號爲優 (表 12)。

綜合以上結果，於 96 年提出申請命名登記，並於 96 年 3 月 16 日經審查委員，正式命名爲甘藷台農 73 號。

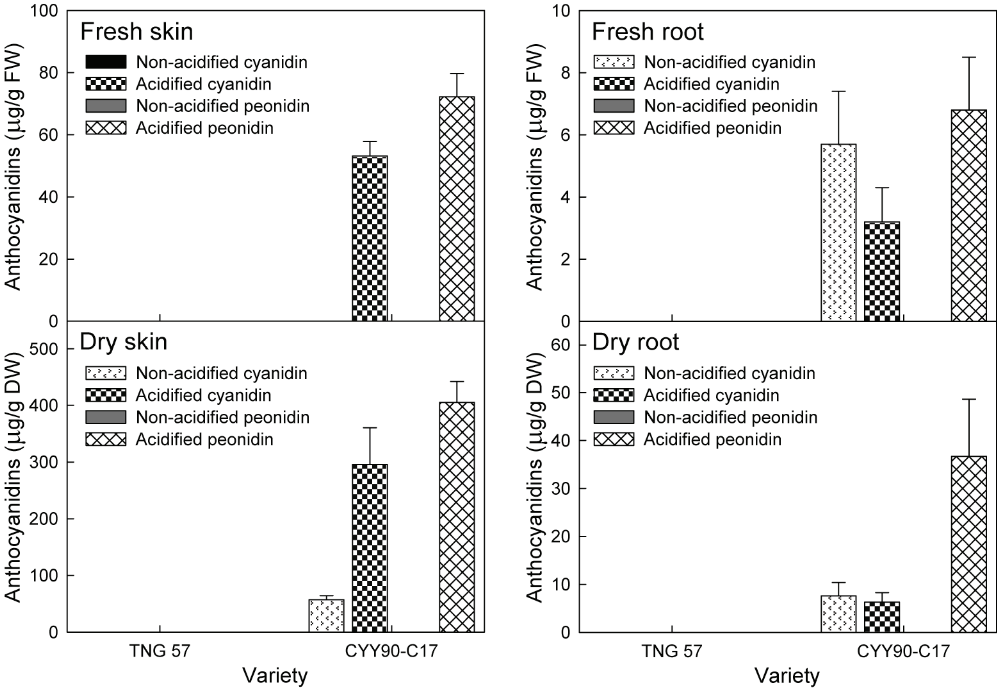

圖 2. CYY90-C17 (台農 73 號) 與台農 57 號塊根之花青素含量變化情形。

Fig 2. Changes of content of anthocyanins in skin and flesh of sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73) and TNG 57 (cv.).

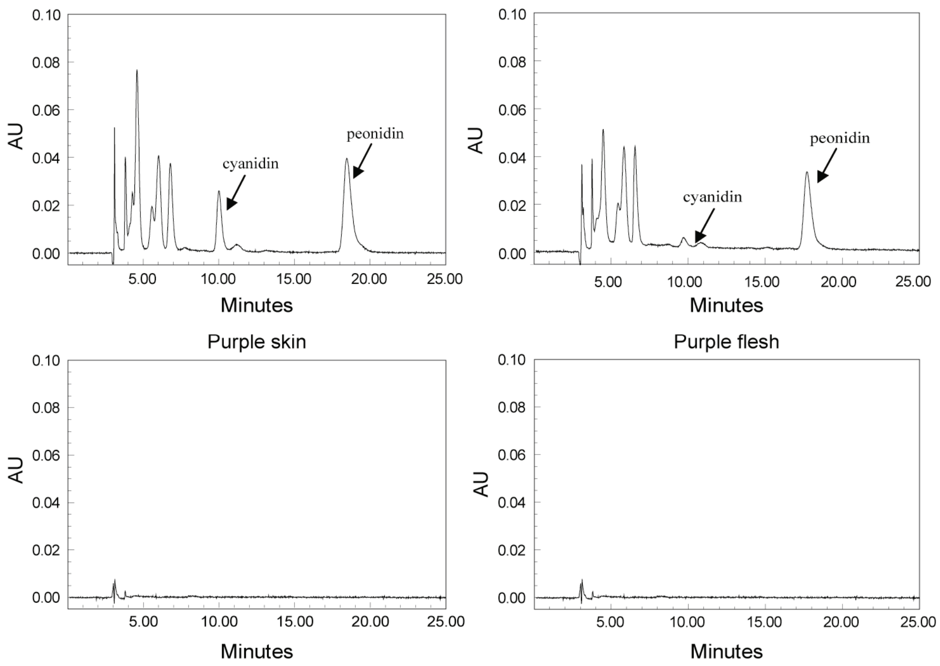

圖 3. CYY90-17 花青素 HPLC 分析圖譜。

Fig 3. Maps of HPLC analysis of anthocyanins in skin and flesh of sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73).

表 12. CYY90-C17 外觀及蒸煮後食味品評結果 (對照種：台農 57 號)

Table 12. Panel tests on appearance and taste of sweet potato by comparing control cultivar TNG 57 (cv.) with line CYY90-C17 (TNG 73)

Appearance of tuber [z]				Taste of root tuber [z]			
Shape	Skin	Flesh [y]	The degree of browning [x]	Texture	Aroma	Sweetness	Palatability
1.5	1.6	0.1	0.8	0.1	0.1	1.6	0.1

[z] Score: Excellent +2, Good +1, Check 0, Bad -1, Worst -2.
[y] Color of flesh was determined after cooking for 30 minutes.
[x] The degree of browning: Root immersed in 0.25 M catechol for 10 minutes and then determined the degree of browning.

討　　論

CYY90-C17 (台農 73 號) 之塊根產量在第一年產量比較試驗爲每公頃 25,999 kg，較對照種台農 57 號增產 1.3% (表 2)，而第二年產量比較試驗之平均塊根產量爲每公頃 29,334 kg，較對照種台農 57 號增產 21.1% (表 3)，另外二年四地點之區域試驗結果亦顯示，CYY90-C17 (台農 73 號) 之塊根產量平均爲每公頃 35,629 kg，較對照種減產 17.7% (表 4、5、6)，而其塊根產量在二年四地點之穩定係數分析結果亦顯示，CYY90-C17 (台農 73 號) 之塊根產量高於平均塊根產量，穩定係數爲 1.36503 (圖 1、表 6)。另外塊根食品工業發展研究所之化分析結果，亦顯示 CYY90-C17 (台農 73 號) 之還原醣、維生素 E、鈣、磷等成分皆較對照種台農 57 號高 (表 11)，食味品評結果亦顯示

本品種在形狀、皮色等外觀特性皆較台農 57 號優，而蒸煮後之肉色、質地、香氣、甜味及適口性亦均較台農 57 號爲佳 (表 12)。另外本品系之塊根皮色爲淡紅色，肉色爲深紫色，富含 cyanidin 及 peonidin 等花青素，具抗氧化功用 (圖 2、3)。從以上結果顯示台農 73 號具有高產、高營養成分及食味佳之特性，故甘藷新品種台農 73 號 (商品名紫玉) 可作爲鮮食用及烤藷等加工用途。

品種特性

植株性狀：長蔓平均長 154 cm，莖徑平均 0.51 cm，綠色，無茸毛，節間長平均 5.02 cm。鼻形，綠色，葉長平均 11.2 cm，寬 6.8 cm，頂葉綠色，葉形較細小，葉柄綠色，無茸毛。塊根形狀爲紡錘形，表皮爲粉紅色 (圖 4)，光滑，表皮脈少，皮目淺。肉色爲深紫色 (圖 5)。植株開花期自 10 月至 12 月間，植株開花多。

圖 4. CYY90-C17 (台農 73 號) 地下部塊根形狀及皮色。

Fig 4. Sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73), showing size, shape and color of root tubers.

圖 5. CYY90-C17 (台農 73 號) 之紫塊根肉色。

Fig 5. Sweet potato, line CYY90-C17 (TNG 73), showing purple colored flesh.

農藝特性：生長習性爲匍匐性，生育速度中等，莖蔓細小，分枝數中等，平均爲 4.3 支。生育日數秋作約 150 天。最佳種植適期爲秋作 9–10 月。病蟲害中較易受蟻象危害，栽培時仍需注意防範。鮮塊根收量於秋作每公頃平均產量爲 30 t 左右，塊根乾物率約 28–32%，鮮塊根還原醣含量爲每百克鮮藷含 4.46 mg，鮮塊根花青素含量：花青素含量高，而花青素是由 cyanidin 及 peonidin 所組成，藷皮含量較藷肉高。

適栽區特性：土壤質地爲富含有機質之砂質壤土或壤土。並適合台灣中南部等秋作甘藷產區。

產品用途：塊根橫切面褐變程度低，蒸煮後呈泥粉質，適口性佳，適合作爲蒸食用及加工用途 (表 12)。

台農 73 號品種特性

優點：(1) 塊根外形良好，食味佳：台農 73 號之塊根爲紡錘形，整齊美觀，表皮光滑，表皮脈少，皮目淺，塊根品質佳。食味品評結果顯示在形狀、皮色等外觀特性皆較台農 57 號優，而蒸煮後之肉色、質地、香氣、甜味及適口性亦均較台農 57 號爲佳，而肉質氧化褐變度低之特性亦較台農 57 號爲優。(2) 塊莖產量穩定，適應性廣：綜合二年區域試驗四個地點綜合變方分析之結果顯示台農 73 號塊根平均每公頃產量爲 35,629 kg，雖較對照種台農 57 號低，但紫肉甘藷品系之塊根產量皆較低，故品系台農 73 號塊根產量每公頃平均高於 30 t，顯示其塊根產量極爲穩定。另外台農 73 號在四個試驗地點經二年不同環境下，其塊根產量經穩定性分析結果顯示，台農 73 號之塊根產量平均爲每公頃 35,629 kg，穩定係數爲 1.36503，故該品系在不同年份及地區下爲高產且穩定之品系。(3) 塊根營養成分含量高：台農 73 號還原醣、維生素 E 及鈣、磷皆較對照種台農 57 號高，其他化學成分則以台農 57 號較高，而塊根花青素含量高，而花青素是主要由 cyanidin 及 peonidin 所組成，其中藷皮含量較藷肉高。(4) 對蟻象抗性較推廣品種台農 66 號優。

缺點：(1) 塊根產量每公頃平均爲 30 t，爲中等收量品種。(2) 對病毒病爲感性，故宜種植健康種苗。

栽培要點及注意事項

(1) 合秋作栽培，尤其中南部秋作甘藷栽培區。(2) 合砂質壤土及鬆軟之壤土栽培。(3) 適行株距爲 100 × 25 cm。(4) 公頃三要素施用量爲 N 60 kg，P_2O_5 30 kg，K_2O 180 kg，施用時以氮肥、鉀肥半量及磷肥全量作爲基肥施用，另半量之氮肥及鉀肥於中耕時作爲追肥施用 (擬依各推廣區依各地土壤肥力檢定結果，進行肥料推薦使用量)。(5) 種植後 3 天內，噴施萌前殺草劑，抑制雜草發生 (施用藥劑請參考行政院農業委員會植物保護手冊雜糧作物部分)。(6) 本品系對軟腐病呈感性，收穫時應注意減少甘藷塊根破損，以減少病菌由傷口感染機會，降低損失風險。(7) 甘藷蟻象防治，以性費洛蒙生物防治，於甘藷插植後即設置性費洛蒙誘蟲器，誘蟲器相距約 15 m，每隔 2–3 週檢視並清除捕獲的蟻象，同時變換誘蟲器位置，以降低蟻象之密度及危害。

誌　　謝

研究承甘藷組同仁周振東、邱顯仁、劉光滿、陳慶宏在田間管理及資料調查之協助，同時感謝周曉慧小姐及吳信儀先生在資料整理及病蟲害檢定之協助，特表謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

Bridle, P. and C. F. Timberlake. 1997. Anthocyanins as food colours-selected aspects. Food Chem. 58:103–109.

Li, L. 1957. Studies on the field technique of sweet potatoes experiments in Taiwan. J. Agric. Assoc. China New Ser. 19:1–10. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1962. Study on the relative efficiency of lattice and randomized complete block designs by field trials on sweet potatoes. J. Agric. Assoc. China New Ser. 40:40–49. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1964. Study on variety environment interactions in regional sweet potato varietal tests and their implications on test procedures. J. Agric. Assoc. China New Ser. 45:1–17. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1967. Study on the combining ability in crosses among five varieties of sweet potato. J. Agric. Assoc. China New Ser. 58:33–43. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1971. Studies on the sampling techniques in field trial of sweet potato. J. Agric. Assoc. China New Ser. 73:9–22. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1974. Studies on the variation and mean performance in successive generations of a randomly intermating population of sweet potatoes. J. Taiwan Agric. Res. 23(4):255–262. (in Chinese with English abstract)

Li, L. 1980. Study on the selection criteria for hybridized progenies of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. National Sci. Council Monthly 8(10):930–940. (in Chinese with English abstract)

Li, L. and C. H. Liao. 1994. The achievement and prospect of sweet potato breeding in Taiwan. p.11–28. *in*: Root Crop Yield Improvement, Processing and Utilization. Agric. Res. Inst. Pub. No.45. Taichung, Taiwan, ROC. (in Chinese with English abstract)

Lu, H. Y. 1994. The SAS procedure of regression model for stability analysis. J. Agric. Assoc. China. 43:283–292. (in Chinese with English abstract)

Montgomery, D. C. 1984. Factional factorial design. p.325-354. *in*: Design and Analysis of Experiments. John Wiley and Sons. New York, USA.

Teow, C. C., V. D. Truong, R. F. McFeaters, R. L. Tomposon, K. V. Pecota, and G. C. Yencho. 2007. Antioxidant activities, phenoic and β-carotene content of sweet potato genotypes with varying flesh colours. Food Chem. 103:829–838.

Breeding of the New Sweet Potato Variety, Tainung No. 73[1]

Yung-Chang Lai[2,4], Zhong-Tian Li[2], Toong-Long Jeng[3], and Wu-Hsiung Tsai[2]

Abstract

Lai ,Y. C. , Z. T. Li, T. L. Jeng, and W. H. Tsai. 2008. Breeding of the new sweet potato variety, Tainung No. 73. J. Taiwan Agric. Res. 57:279–294.

Tainung No.73, a new sweet potato variety, was developed and released through hybridization of TNG 62 (♂) and a local variety with purple flesh (♀) in 2000 and further selection of offspings in 2001. The selected line CYY90-17 was formally approved for registration and designated as variety Tainung No.73 (TNG73) on March 16, 2007, after a series of testing and evaluation, including preliminary (2002) and advanced (2003) yield trials and regional trials (2005-2006). The root-tuber yield of Tainung No.73 was 25,999 kg/ha in 2002 (1.2% higher than the control variety, Tainung No.57), 29,334 kg/ha in 2003 (21.1% higher than the control variety, Tainung No.57), and averaged yield 33,899 kg/ha in 2005 and 2006 (lower than Tainung No.57). The root-tuber yield of TNG No.73 is stable, over 30 t/ha in planting time, planting density and fertilization trials. Root-tuber of TNG No.73 is spindle shape with pinkish red skin and purple flesh. Root-tuber of TNG No.73 is rich in anthocyanin (an anti-oxidant) which is higher in root skin than in root flesh. Root-tuber of TNG No.73 can be used as table food for its flavor as well as health food for its rich source of anti-oxidant. This is the first purple variety developed through breeding in Taiwan.

Key words: Sweet potato, Purple flesh, Yield trial, Regional trial, Anthocyanin.

---

1. Contribution No.2336 from Agriculture Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 5, 2008.
2. Respectively, Associate Agronomist and Head of Department Agronomy, Retired Assistant, and Senior Plant Pathologist and director of AES, Chiayi Agricultural Experiment Station (AES), ARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
3. Associate Agronomist, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: davidlai@dns.caes.gov.tw; Fax: (05)2774009.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):295–304 (2008)

台灣銅皮石斛的種子發芽及大量繁殖[1]

羅淑芳[2] 郭昭麟[3] 陳宗禮[4] 蔡新聲[5,6]

摘　　要

羅淑芳、郭昭麟、陳宗禮、蔡新聲。2008。台灣銅皮石斛的種子發芽及大量繁殖。台灣農業研究 57:295–304。

銅皮石斛授粉後 12 週的種子培養於含 1/2 MS 基本鹽類，添加 3%蔗糖及 0.9% Difco agar 之培養基，所獲得的綠苗數及植株的鮮重最高，為最佳的播種適期，而培養於 KC 及 VW 培養基均無綠苗形成。自 1/2 MS 培養基所產生的幼苗，經培養於全量 MS 基本鹽類，添加 3–4.5%蔗糖的培養基所獲得單株平均鮮重最佳，但根部生長情形不利於移植；減低蔗糖濃度至 1.5%並配合 8%香蕉泥、8%馬鈴薯汁及 8%椰子汁液之 MS 基本鹽類之有機添加物，對於植株的鮮重、株高及根數的效果最佳。

關鍵詞：銅皮石斛、種子發芽、大量繁殖。

前　　言

石斛之名最早見于「山海經」，石斛的應用從最早記載石斛的「神農本草經」曰 "……味甘、無毒、補五臟虛勞、久服厚腸胃、逐皮膚邪熱，痱氣，定志除驚…… "，由此可見其功能與作用範圍相當廣泛。根據李時珍「本草綱目」載于草部石草類，諸家本草亦多記載，藥用部分是新鮮或乾燥的莖 (Li *et al*. 1986)。Syu *et al*. (1980) 指出石斛是目前民間最名貴的眼科用藥，被用來作為視力的保健與治療，尤其在紓緩癌症病患因化學治療所產生之副作用 (如口乾舌燥、心跳急促等)，用途廣且有效，常用的成方有石斛清胃湯及石斛湯等 (Syue 1994)。

常用的中藥石斛物種繁多，其中以六安及穎川府霍山縣，所產的霍山石斛的產量最多，質量最佳；中國大陸學者經過採集調查霍山石斛藥材標本和原植物，結果發現石斛實際上包括五種石斛屬 (*Dendrobium* Sw.) 植物，即鐵皮石斛 (*D. candidum* Wall. et Lindl.)、米石斛 (*D. huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)、銅皮石斛 [*D. moniliforme* (L.) Sw.]、金釵石斛 (*D. nobile* Lindl.) 及黃花石斛 (*D. tosaense* Makino)，其中以米石斛最為名貴。台灣有櫻石斛 (*D. linawanum* Reichb. f.)、銅

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2337 號。接受日期：97 年 11 月 18 日。
2. 本所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
3. 中國醫藥大學中藥資源學系副教授兼系主任。台灣 台中市。
4. 中興大學農藝學系教授。台灣 台中市。
5. 朝陽科技大學生化科技研究所教授兼所長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
6. 通訊作者，電子郵件：hstsay@cyut.edu.tw；傳真機：(04)2374371。

皮石斛、黃花石斛等藥用石斛的分布，其中櫻石斛爲金釵石斛藥材主要基原之一 (Cuei 1989)，亦是常用、珍貴且十分稀有之中藥植物，具有養陰、益胃與生津止渴之功效 (Syue 1984)。

近年來由於民間傳統療法大量使用野生藥用植物，造成台灣原生種石斛類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，使用其同屬之植物爲代用品，而代用品不但沒有具體的療效，更造成野生藥用石斛的濫採。本試驗針對台灣產的銅皮石斛探討最適宜的播種時期及培養基，並進行培養基中添加不同的蔗糖濃度及有機添加物對於幼苗生長的研究，以大量繁殖台灣原生的藥用銅皮石斛材料。

材料與方法

不同鹽類培養基對銅皮石斛種子發芽之影響

自宜蘭縣棲蘭山柳杉林採集到銅皮石斛，其莖呈圓柱形，葉片爲長披針型，花瓣爲白色，唇瓣有一帶狀棕色 (圖 1)；以不同植株間進行人工授粉，取授粉後 9–15 週的果莢，以 70%酒精擦拭後，再以 1%次氯酸鈉溶液振盪消毒 10 min，經無菌水清洗 3–4 次，將果莢剖開，利用環形播種棒取出種子，分別培養於 MS (Murashige & Skoog 1962)、1/2 MS (半量 MS 無機鹽類＋全量有機成分)、KC (Knudson 1946) 及 VW (Vacin & Went 1949) 等四種不同基礎鹽類之培養基，並添加 3%蔗糖。培養基於加入凝膠物質前，先用 0.5 N NaOH 或 HCl，將 pH 值調至 5.7 ± 0.1，再加入 0.8% Difco agar，以試管 (直徑 22 × 長 120 mm) 爲培養容器，內含 10 mL 培養基，以 121℃、1.05 kg/cm^2 之高溫高壓滅菌 15 min 後，擺成長約 7 cm 的斜面，每支試管約播種 300 個種子，於光照 (1,500 lux) 16 h、溫度 25 ± 2℃培養 16 週後，調查每支試管的綠苗數、綠苗的鮮重 (g)、綠色原球體 (green-protocorm) 及白色原球體 (white-protocorm) 的數目。

不同蔗糖濃度對銅皮石斛植株生長之影響

將高度約 0.5 cm 的綠苗培養於 MS 全量培養基，添加 8%香蕉泥 (取黃熟的香蕉去皮後稱取 80 g)，0.9% Difco agar 配合 0、1.5、3.0、4.5 及 6.0 %等不同濃度的蔗糖，以 500-mL 三角瓶爲培養容器，充填 100 mL 培養基，將 pH 調至 5.7 ± 0.1，經高溫高壓殺菌後，每瓶種植 25 棵幼苗，置於光照 16 h，溫度 25 ± 2℃環境下，培養 24 週後調查植株鮮重 (g)、株高 (cm) (自莖基部至頂部葉片的先端)、莖厚度 (mm) (量自莖基部 1 cm 處)、展開葉片數、株數、根數及根長 (cm) (取最長的根) 等性狀。

多種有機添加物對銅皮石斛植株生長之影響

銅皮石斛播種後所獲得綠苗生長至高度約 0.5 cm 後培養於 MS 基本鹽類，添加 1.5% sucrose 及 0.9% Difco agar 爲基本培養基，再添加 8%香蕉泥、馬鈴薯汁或椰子汁液等組成 8 種不同組合培養基。香蕉泥的配置方法爲取黃熟的香蕉去皮後稱取 80 g 加水攪拌成泥狀，再加入培養液最後定量至 1 L；馬鈴薯汁及椰子汁液的配置方法分別爲將馬鈴薯去皮後榨汁，而椰子汁液爲取自綠色的椰子，各取出汁液 80 mL 培養液最後定量至 1 L。培植體接種後置於光照下培養 24 週，調查調查植株鮮重 (g)、株高 (cm)、莖厚度 (mm)、展開葉片數、根數及根長 (cm) 等性狀。

資料統計與分析

試驗所得資料則利用 Least Signification Difference test (LSD) 比較各處理平均値間之差異。

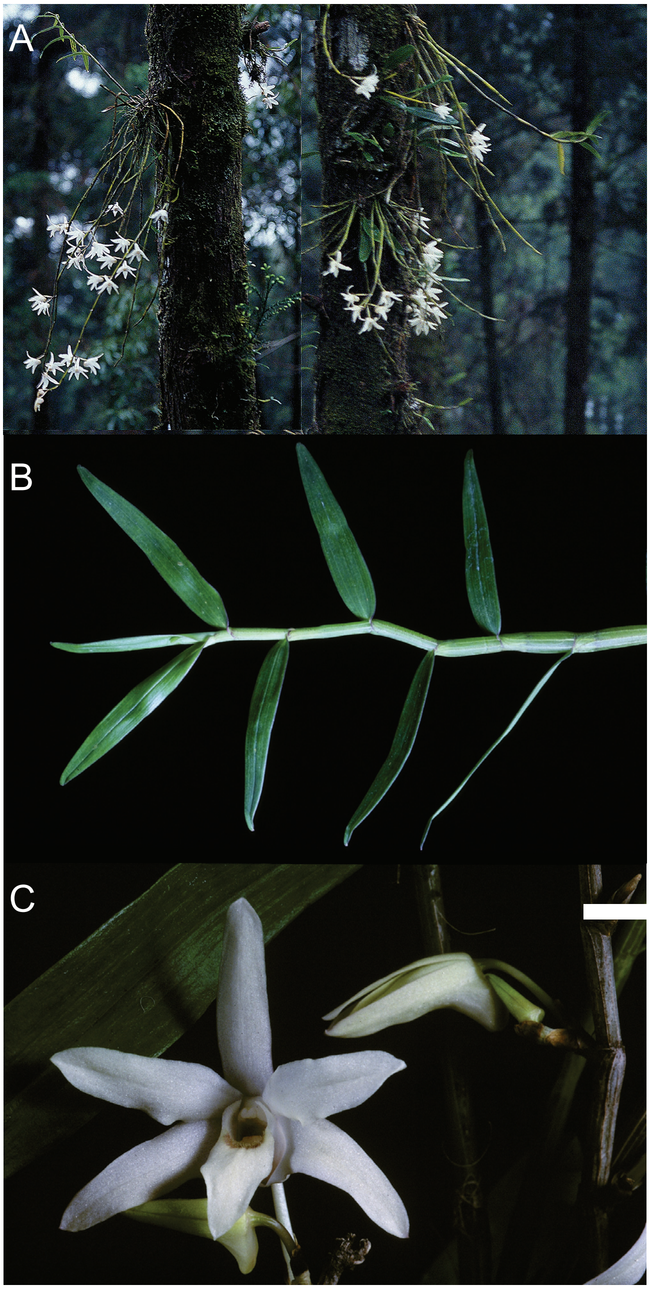

圖 1. 台灣產銅皮石斛 (A) 採自棲蘭山；(B) 莖呈圓柱形，葉片為長披針型；(C) 花瓣為白色，唇瓣有一帶狀棕色。

Fig 1. Native *Dendrobium moniliforme* (A) plants collected from Chi-Lan mountain, I-Lan, Taiwan; (B) a cylindrical stem with long, narrow leaves; (C) a flower showing white petals and a lip petal with a brown colored band. (bar = 1.0 cm).

結　果

不同鹽類培養基對銅皮石斛種子發芽之影響

取不同授粉時期的種子培養於 1/2 MS、MS、KC 及 VW 等四種不同鹽類的培養基，培養 16 週後調查發芽率，結果如表 1，顯示銅皮石斛取授粉後 12 週的種子，播種於 1/2 MS 培養基可獲得最多的綠苗達 134.8 株/每支試管 (發芽率約 45%)，而植株的平均鮮重亦達 0.6 g，其次爲授粉後 13 週的種子，其綠苗數及植株鮮重次之；若取授粉後 12–13 週的種子，培養於 MS 全量的培養基，較不利於種子的萌發及植株的生長；而不同時期的種子播種於 KC 及 VW 培養基均無綠苗形成 (圖 2)，顯示銅皮石斛的最佳播種培養基爲 1/2 MS 培養基。若取授粉後 9 週的種子，不論播種於 MS

表 1. 不同時期的種子及培養基對於銅皮石斛發芽的影響

Table 1. Effect of culture medium and seed maturity on seed germination of *Dendrobium moniliforme* [z]

Seed maturity (Weeks after pollination)	Basal Medium	Average number of seedlings per test tube	Fresh weight of seedlings per test tube (g)	Average number of green protocorm per test tube	Average number of white protocorm per test tube
9	1/2 MS	0.0 f [y]	0.00 e	0.00 j	5.50 g
	MS	0.0 f	0.00 e	0.17 j	1.67 g
	KC	0.0 f	0.00 e	0.00 j	0.00 g
	VW	0.0 f	0.00 e	0.00 j	0.00 g
10	1/2 MS	82.5 c	0.31 cd	48.25 c	2.75 g
	MS	95.6 c	0.76 a	30.00 cd	50.40 f
	KC	0.0 f	0.00 e	16.20 gh	0.80 g
	VW	0.0 f	0.00 e	46.00 c	3.40 g
11	1/2 MS	91.9 c	0.66 ab	130.38 a	21.50 g
	MS	46.3 d	0.48 bc	69.29 b	86.86 de
	KC	0.0 f	0.00 e	21.43 de	6.71 g
	VW	0.0 f	0.00 e	51.14 bc	12.43 g
12	1/2 MS	134.8 a	0.60 ab	41.00 cd	107.11 cd
	MS	25.0 e	0.15 de	15.80 gh	179.50 a
	KC	0.0 f	0.00 e	41.60 cd	12.13 g
	VW	0.0 f	0.00 e	34.00 cd	12.27 g
13	1/2 MS	115.0 b	0.49 bc	49.10 c	70.80 ef
	MS	24.9 e	0.19 de	11.80 hi	152.30 b
	KC	0.0 f	0.00 e	3.20 ij	0.20 g
	VW	0.0 f	0.00 e	25.50 cd	17.30 g
14	1/2 MS	52.4 d	0.23 de	20.56 ef	12.67 g
	MS	15.3 ef	0.11 de	8.88 hi	80.00 e
	KC	0.0 f	0.00 e	5.41 hi	1.06 g
	VW	0.0 f	0.00 e	19.53 fg	4.41 g
15	1/2 MS	84.4 c	0.70 a	45.88 c	117.75 c
	MS	29.8 e	0.14 de	5.70 hi	189.90 a
	KC	0.0 f	0.00 e	7.64 hi	4.09 g
	VW	0.0 f	0.00 e	16.36 gh	11.55 g

[z] Culture media: Each basal medium 1/2 MS, MS, KC, or VW contained 3% sucrose and 0.9% Difco agar, pH = 5.7 ± 0.1. Data were collected after at 16 weeks after sowing. Average of 30 test tubes per treatment.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different according to LSD test.

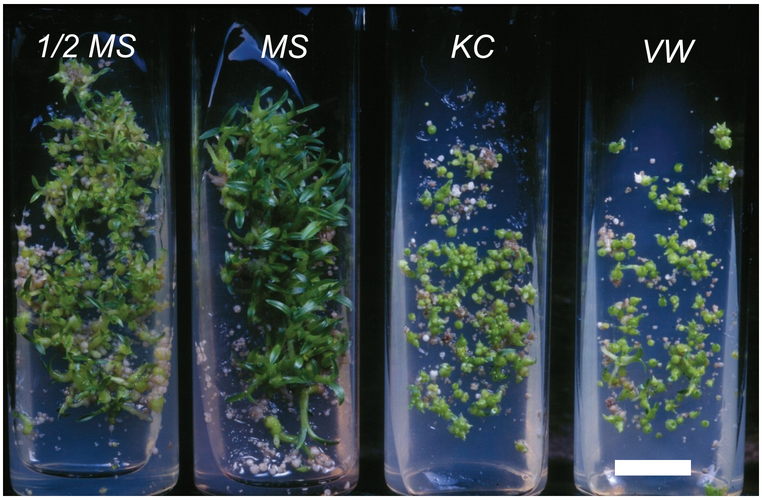

圖 2. 銅皮石斛授粉後 12 週的種子播種於 1/2 MS、MS、KC 及 VW 四種培養基，培養 16 週後調查發芽之情形。

Fig 2. Plantlets of *Dendrobium moniliforme* from seeds harvested at 12 weeks after pollination and cultured on media of 1/2 MS, MS, KC, and VW media for 16 weeks. Note differences in number and size of plantlets in these media. (bar = 1.0 cm).

或 1/2 MS 培養基均無植株形成；隨著種子漸成熟 (約授粉後 12–13 週) 有利於發芽，其中以授粉後 12 週為最適的播種期，而超過 14 週以後，則又不利於播種。

不同蔗糖濃度對銅皮石斛植株生長之影響

銅皮石斛的幼苗培養於全量 MS 培養基，8%香蕉泥及 0.9% Difco agar，添加 0–6%不同濃度的蔗糖培養基，結果以培養於 3–4.5%的蔗糖培養基，單株的平均鮮重達 0.5–0.52 g 最高，其次為 1.5% 及 6%的蔗糖；而不添加蔗糖的培養基植株生長不佳；植株的高度以 3%蔗糖的效果最好，其次為 1.5%及 4.5%；而植株莖的厚度不同處理之間無顯著的差異；展開葉片數及芽數雖以 1.5%蔗糖處理效果最佳，但根數及根長的效果卻較差 (表 2)；隨著蔗糖濃度的提高，則不利於根的生長也不利於組培苗移植 (圖 3)，因此仍以選擇較低的蔗糖濃度 (1.5%)，作為銅皮石斛幼苗生長的主要碳源濃度。

多種有機添加物對於銅皮石斛植株生長之影響

銅皮石斛培養於全量 MS 培養基添加 1.5%蔗糖、0.9% Difco agar 及不同有機添加物組合之 8 種培養基，結果發現單獨添加 8%香蕉泥或馬鈴薯汁液對於植株的鮮重、株高、根數及根長的效果均較單獨添加椰子汁液佳；但對於整體植株的生長效果，以 8%香蕉泥＋8%馬鈴薯汁液，或 8%香蕉泥＋8%馬鈴薯汁液＋8%椰子汁液的 2 組培養基，對於植株的鮮重、株高及根數的效果最佳，兩者無顯著性差異；其次為添加 8%香蕉泥＋8%椰子汁液或 8%馬鈴薯 8%椰子汁液，所以綜合以上結果可知，3 種有機添加物的組合較僅添加單種有機添加物或不加任何有機添加物，使植株生長效果良好 (表 3)。

表 **2.** 不同蔗糖濃度對於銅皮石斛幼苗生長的影響

Table 2. Effect of sucrose concentrations in MS basal medium on seedling growth of *Dendrobium moniliforme* [z]

Sucrose conc. (%)	Number of explants cultured	Fresh wt. (g)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Number of expanded leaves	Number of branch	Number of roots	Root length (cm)
0	100	0.21 c [y]	6.82 d	1.32 a	5.75 b	1.94 ab	3.80 d	2.90 d
1.5	100	0.37 b	9.20 b	1.24 a	7.89 a	2.22 a	5.23 c	4.96 c
3.0	100	0.52 a	10.34 a	1.18 a	5.24 bc	1.80 b	5.58 c	7.54 a
4.5	100	0.50 a	9.52 b	1.28 a	4.90 cd	1.74 b	7.16 b	5.83 b
6.0	100	0.38 b	7.89 c	1.23 a	4.41 d	1.66 b	8.00 a	5.13 c

[z] Culture medium: Full strength MS basal medium containing 8% banana and 0.9% Difco agar, pH 5.7. Data were collected after cultured for 24 weeks.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different according to LSD test.

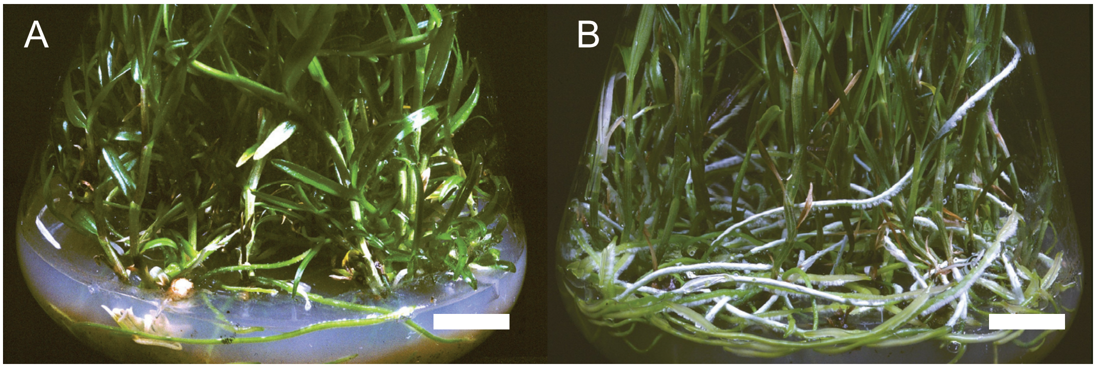

圖 **3.** 不同蔗糖濃度對銅皮石斛植株根部生長的影響。(A) 銅皮石斛幼苗培養於 1.5%的蔗糖培養基，根部生長正常；(B) 銅皮石斛幼苗培養於 6%的蔗糖者，根部向上生長。

Fig 3. Effect of different sucrose concentrations in MS basal medium on the root growth of *Dendrobium moniliforme*. (A) Normal roots of *D. moniliforme* which cultured on 1.5% sucrose medium, (B) Turn upward roots of *D. moniliforme* which cultured on 6.0% sucrose medium. (bar = 1.0 cm)

討　論

Bao *et al*. (2001) 指出細莖石斛的植物學名為 *D. moniliforme*，別名為銅皮石斛、銅皮蘭、石斛蘭及霍山石斛等，其形態為莖叢生，圓柱形，長 25–40 cm，直徑 3–5 m；葉披針形，多節，節間長 1–2 cm，近基部稍纖細；花為白色至淡黃色，花期 3–5 月；產地為台灣、韓國、日本、印度東北部及中國的安徽、甘肅南部、河南、湖北、湖南、江西、浙江、福建、廣東、廣西、四川、貴州、雲南和西藏東部等地；台灣產的銅皮石斛植株型態莖圓柱形且叢生，葉披針形，花瓣為白色 (圖 1)；台灣與中國產的銅皮石斛植株型態類似。Bhaskar & Rajeevan (1996) 指出進行萬代蘭屬 (*Vanda*) 雜交種子的播種培養基，使用最多的是 1/2 MS 培養基，約佔 80%，其次是 VW 培養基佔 60%，KC 培養基佔 20%，最少的是全量 MS 培養基僅佔 10%。Tu & Lee (1988) 以 1/4、1/3、1/2 和全量

表 3. 不同有機添加物對銅皮石斛幼苗生長的影響

Table 3. Effect of organic compounds on seedling growth of *Dendrobium moniliforme* [z]

Conc. of organic compounds (8%)	Number of explants cultured	Fresh wt. (g)	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	No. of expanded leaves	No.of roots	Root length (cm)
None	100	0.16 cd [y]	4.23 c	1.31 ab	9.0 ab	2.7 d	1.0 d
Banana homogenate	100	0.28 b	4.93 bc	1.21 bcd	7.9 b	4.8 ab	2.7 bc
Potato extract	100	0.29 b	5.18 b	1.12 de	10.2 a	4.5 bc	2.3 c
Coconut milk	100	0.10 d	2.70 d	1.19 cd	10.1 a	2.5 d	0.8 d
Banana homogenate + Potato extract	100	0.48 a	8.12 a	1.35 a	8.3 b	5.7 a	2.9 b
Banana homogenate + Coconut milk	100	0.22 bc	5.34 b	1.04 e	8.7 ab	4.5 b	2.9 b
Potato extract + Coconut milk	100	0.24 bc	4.96 bc	1.28 abc	9.1 ab	3.5 cd	2.6 bc
Banana homogenate + Potato extract + Coconut milk	100	0.43 a	8.16 a	1.23 bcd	9.3 ab	5.7 a	4.4 a

[z] Culture medium: Each treatment contained full strength MS basal medium with 1.5% sucrose and 0.9% Difco agar, pH 5.7. Data were collected after cultured for 24 weeks.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly ($p > 0.05$) different according to LSD test.

MS 培養基，測試蝴蝶蘭種子對總離子濃度之反應，結果全量 MS 之總離子濃度高達 93.8 mM，對發芽有抑制作用，認為與滲透壓過高，胚不易吸水有關，而 1/4–1/2 MS 其總離子濃度範圍為 23.5–46.9 mM，較有利於種子的發芽。Taylor *et al*. (1982) 調查發現樹蘭 (*Epidendrum ibaguence*) 的成熟種子，可累積多量的 cytokinin 和 GAs，因此認為在培養基中不需添加植物生長調節劑，種子的發芽效果良好。Tu (1986) 指出蝴蝶蘭種子的播種培養基，未添加植物生長調節劑，種子均可發芽，擬原球體發育亦正常。綜合上述的報告可知大多數適合蘭科植物種子發芽的培養基，其總離子濃度均比 93.8 mM (全量 MS) 低許多，例如 KC 及 VW 其總離子濃度約 30 mM，並且發現全量 MS 大多抑制種子發芽和擬原球體發育，因此多採用 1/2 MS、KC 或 VW 為蘭科種子發芽的培養基。本試驗在銅皮石斛種子播種的培養基，並沒有添加任何植物生長調節劑，並以 1/2 MS、MS、KC 及 VW 等四種不同鹽類作比較，結果銅皮石斛授粉後 12 週的種子，培養於 1/2 MS 培養基不添加任何植物生長調節劑，可獲得最多的綠苗及鮮重，此時期的果莢未開裂，果莢的顏色尚綠，種子已成熟，胚清楚可見，其種子的發育皆為正常；而全量 MS 造成許多白化的原球體形成，此原因可能為 MS 之總離子濃度太高，對種子發芽產生抑制作用 (表 1)。雖然 KC 及 VW 為蘭科種子經常使用的培養基，但卻不利於銅皮石斛的種子發芽 (圖 2)；此結果與 Wen *et al*. (1999) 以霍山石斛培養於 KC 培養基上，因所含的 Ca^{2+}、Mg^{2+} 濃度較高，造成種子不易萌發有類似的趨勢；而 1/2 MS 的總離子濃度對於銅皮石斛的種子發芽較有利，不需添加植物生長調節劑；類似的結果如 Liu *et al*. (1988) 將鐵皮石斛的種子播種於 1/2 MS 培養基，沒有添加 NAA 及 BA 條件下，可使種子發芽。

Arditti (1979) 指出在蘭科組織培養中，常使用的有機碳源包括葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose) 及蔗糖 (sucrose)；而在蘭花播種和幼苗生長上，蔗糖常用之濃度為 2%。本研究結果顯示不同濃度的蔗糖對於銅皮石斛植株生長，以 1.5%的蔗糖對於展開葉片數及芽數最好，根數及根長的效果不佳，但實際觀察根的生長角度是埋入培養基中，較有利於後期的移植，根部不易斷裂；而 6%的蔗糖濃度使根生長發達，但抑制株高及葉片的展開，並且 3–6%的蔗糖因滲透壓的因素，使根部延著

瓶管壁往上長，此現象不利於組培苗的移植 (表 2、圖 3)；Yates & Curtis (1949) 指出蝴蝶蘭無菌播種的小苗，若根系太長，出瓶時種植不易，而且容易受傷而腐爛，業者視爲品質不佳之瓶苗。有機添加物方面 Withner (1974) 認爲椰子水、香蕉泥除含有天然 cytokinin 及其他荷爾蒙外，尙含有維生素、胺基酸等物質，亦可作爲天然的螯合劑 (chelating agent)，使鐵或其必需元素保持可溶性而不致沉澱。Juang & Lee (1986) 則認爲椰子汁能明顯地促進台灣一葉蘭，早期原球體及小苗的發育，但對小苗後期則影響不大，只有 10%的椰子汁能促進葉的伸長，5%及 20%於小苗生長後期略有抑制作用。Chen & Chen (1998) 將文心蘭 (*Oncidium* Gower) 培養於 1/2 MS 培養基中，單獨加入 3 g/L Tryptone、50 g/L 香蕉、50 g/L 胡蘿蔔、50 g/L 馬鈴薯或混合三種成分，結果顯示同時添加香蕉、馬鈴薯及 Tryptone 三種有機添加物的培養基，其植株不論在株高、葉數、根數、鮮重及乾重上的表現均較其它組合爲佳。本試驗同樣也發現培養基內混合添加三種有機添加物 (即 8%香蕉泥＋8%馬鈴薯汁液＋8%椰子汁液)，對於銅皮石斛植株的生長效果最佳，單獨添加單種有機添加物或不添加任何有機添加物，則使植株生長緩慢 (表 3)，結果與前述學者之研究有相同的趨勢。

引用文獻 (Literature cited)

Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. p.422–635. *in*: Advances in Botanical Research. (Woolhouse, H. W., ed.) Vol. 7. Academic Press. New York.

Bao, X. S., Q. S. Shun, and L. Z. Chen. 2001. The Medicinal Plants of *Dendrobium* (Shihu) in China. Fudan Univ. Pub. Shan-Hai. 109 pp. (in Chinese)

Bhasker, J. and P. K. Rajeevan. 1996. Embryo culture of *Vanda*'John Club'. Indian Hort. 44:36–38.

Chen, F. C. and T. C. Chen. 1998. Effect of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm-like-bodies and plantlets of *Oncidium* Gower Ramsey. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 44: 403–412. (in Chinese with English abstract)

Cuei, S. D. 1989. Complete Collection of Traditional Chinese Herbs. Heilongjiang Science and Technology Press. Heilongjiang. 1163 pp. (in Chinese)

Juang, J. H. and N. Lee. 1986. Effect of activated charcoal, sucrose and mineral concentration on seed germination and seedling growth of *Pleione formosana*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 32: 61–69. (in Chinese with English abstract)

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. Am. Orch. Soc. Bull. 15: 214–217.

Li, M. F., G. J. Syu, L. S. Syu, and R. Y. Jin. 1986. Survey and identification of commercial samples of Shihu (*Dendrobium* Sw.). Chinese Med. 17:33–36. (in Chinese)

Liu, R. J., A. D. Meng, X. Q. Deng, and Y. R. Li. 1988. Studies on rapid propagation of *Dendrobium candidum in vitro*. Acta Pharm. Sinica 23:636–640.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473–497.

Syu, L. S., G. J. Syu, W. L. Shia, and J. Y. Lo. 1980. Studies on the microscopic identification of the Chinese drug Shihu I. Bull. Nan-Jyun Phamacol. Inst. 2:1–4. (in Chinese)

Syue, J. W. 1984. Review of Chinese Medicine Varieties, Center Volume. 1st ed. Shan-Hai Sci. Tech. Pub. Shan-Hai. 543 pp. (in Chinese)

Syue, J. W. 1994. Review of Chinese Medicine Varieties, Center Volume. 2nd ed. Shan-Hai Sci. Tech. Pub. Shan-Hai. 639 pp. (in Chinese)

Taylor, J. S., S. J. Blackman, and E. C. Yeung. 1982. Hormonal structural aspects of fruit development on the orchid, *Epidendrum*. J. Exp. Bot. 33:495–505.

Tu, M. C. 1986. Studies on Capsule Development and Effects of Media Composition on Seed Germination and Seedling Growth in *Phalaenopsis* (white hybrid). Master Thesis. Graduate Institute of Horticulture, National Taiwan Univ. Taipei. 128 pp. (in Chinese)

Tu, M. C. and N. Lee. 1988. Effect of nitrogen, sucrose concentration and light intensity on seed germination and seedling growth in *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 34: 293–302. (in Chinese with English abstract)

Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110:605–613.

Wen, Y. F., R. L. Lu, and Z. L. Xie. 1999. Rapid propagation and induction of floral buds of *Dendrobium huoshanase*. News Plant Physiol. 35:296. (in Chinese)

Withner, C. L. 1974. Developments in orchid physiology. p.129–168. *in*: The orchids, a Scientific Survey (Withner, C. L., ed.) Wiley-Interscience. New York.

Yates, R. C. and J. T. Curtis. 1949. The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings. Am. J. Bot. 36: 390–396.

In Vitro Seed Germination and Mass Propagation of *Dendrobium moniliforme*, a Native Species in Taiwan[1]

Shu-Fang Lo[2], Chao-Lin Kuo[3], Chung-Li Chen[4], and Hsin-Sheng Tsay[5,6]

Abstract

Lo, S. F., C. L. Kuo, C. L. Chen, and H. S. Tsay. 2008. *In vitro* seed germination and mass propagation of *Dendrobium moniliforme***,** a native species in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:295–304.

An *in vitro* study was conducted to examine seed germination *Dendrobium moniliforme* harvested at different maturity stages on three different media. Results showed that the maximum number of germination rates and fresh weight of plantlets were obtained when results showed that the treatment of 12-week-old seeds on the 1/2 MS medium supplemented with 3% sucrose and 0.9% Difco agar was the best for seed germination and fresh weight of plantlets. Seeds on the other two media, KC and VW, produced only albino plantlets. The maximum biomass was obtained when the young seedlings were subcultured on the MS medium supplemented with 3–4.5% sucrose, but these seedlings were unsuitable for transplanting due to turn upward roots. However, the medium containing MS basic salt, 1.5% sucrose, 8% each of banana homogenate, potato juice and coconut milk and 0.9% Difco agar was suitable for maximum production of biomass.

Key words: *Dendrobium moniliforme*, *In vitro* seed germination, Mass propagation.

---

1. Contribution No.2337 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 18, 2008.
2. Assistant Researcher, Chiayi Agricultural Experiment Branch, ARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
3. Associate Profesor and Chairman, Department of Chinese Medicine Resources, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Professor and Director, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
6. Corresponding author, e-mail: hstsay@cyut.edu.tw; Fax: (04)23742371.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):305–316 (2008)

丹參毛狀根培養建立與其丹參酮產量之研究[1]

陳威臣[2] 詹効松[4] 李秋儀[2] 曹進義[2] 劉禎祺[3] 李艷琪[3] 夏奇鈮[2,5]

摘 要

陳威臣、詹効松、李秋儀、曹進義、劉禎祺、李艷琪 、夏奇鈮。2008。丹參毛狀根培養建立與其丹參酮含量之研究。台灣農業研究 57:305–316。

本研究以丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 無菌瓶苗葉片經農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, R1601) 感染所得之毛狀根爲材料，測試毛狀根接種部位、接種量及培養時間在液態培養系統中，對於生質量與其丹參酮類 (tanshinones) 含量之影響。分別以固態與液態培養根尖與根段培植體之試驗結果顯示，根尖培植體於液態培養條件下有較高生質量與丹參酮類含量。毛狀根接種量試驗以每 20 mL 培養液接種 5–20 條根尖培植體，結果顯示當培養達 8 週時，10 至 20 根尖處理組間之乾重與丹參酮類含量的差異並不顯著，其中以 10 根尖處理效果較佳。毛狀根之錐形瓶液態時序培養結果顯示，培養液中蔗糖與氨態氮含量於培養第 3 週時分別降至初始濃度之 9%與 10%，此時毛狀根乾重累積有減緩之現象，推測蔗糖與氨態氮可能爲丹參毛狀根生長限制因子。丹參毛狀根在培養 6 週後可達最高乾重約爲 5.8 g L^{-1}，此時收穫之毛狀根與培養液經高效液相層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析毛狀根與培養液之結果顯示，其三種主要丹參酮類產量僅約 11.4 mg L^{-1}；若繼續培養至第 8 週則丹參酮類產量可達約 64 mg L^{-1}。

關鍵詞：丹參、時序培養、氮源、蔗糖、二次代謝物。

前 言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 爲唇形科 (Labiatae) 鼠尾草屬 (*Salvia*) 多年生草本植物，其乾燥根具有活血化瘀之功效，列爲神農本草經上品，是治療心血管疾病的之重要中藥。丹參藥效成分主要包括脂溶性二萜類 (diterpenoids) 之丹參酮Ⅰ (tanshinoneⅠ; TanⅠ)、丹參酮ⅡA (tanshinone ⅡA; Tan ⅡA) 及隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)，以及水溶性之酚酸類 (phenolic acid) 之丹參

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2339 號。接受日期：97 年 11 月 21 日。
2. 本所生技組助理研究員、計畫助理、聘用人員與副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所農化組助理研究員與助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 朝陽科技大學生化科技所助理教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
5. 通訊作者，電子郵件：cnhsia@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04) 23302806。

素 (Salvianic acid A)、丹酚酸 A (salvianolic acid A) 與丹酚酸 B (salvianolic acid B) 等 (Hu *et al*. 2005; Li *et al*. 2002)；現代藥理研究證實丹參具有保護心肌缺血及缺氧、改善微循環、抑制血小板聚集和血栓形成及抗菌消炎等作用，尤其對於冠心病與心絞痛具有良好的療效 (Hu *et al*. 1999; Park *et al*. 1999)。此外，Wu *et al*. (1998) 亦指出丹參具有抗氧化、降膽固醇和預防動脈硬化效果，其臨床治療上的潛能不容忽視。目前丹參市場所需藥材皆來自中國，因人爲大量採挖已造成丹參野生資源逐漸減少，近年來已積極進行丹參栽培，然各地藥材品質參差不齊，更有僞劣品充斥市場的現象 (Guo *et al*. 2002)。此外，近來植物藥材在美國、印度與巴西均被檢驗出有重金屬污染與農藥殘毒等問題 (Saper *et al*. 2004; Caldas & Machado 2004)。各國政府因而紛紛針對植物藥材製品實施層層把關，以維護全球數百萬人使用植物藥材製品的安全性。

利用植物組織、細胞與器官培養方式可直接獲取培養物之有效活性成分，具有不受天候影響、提高二次代謝物產率與縮短培養週期等諸多優點，具有商業開發之潛力與價值 (Kim *et al*. 2002; Nalawade *et al*. 2003)。植物細胞商業化生產二次代謝物雖可行但成功案例並不多，主要遭遇的困難爲培養植物細胞或組織之遺傳穩定性及其二次代謝物生產之調控，故如何建立一個穩定的植物細胞/組織培養系統，並藉由代謝調控的方式增加二次代謝物的產率，乃爲商業化生產的首要步驟 (Roberts & Shuler 1997; Zhong 2001)。相較於一般懸浮細胞培養系統，毛狀根培養應用於二次代謝物生產具有高穩定性、高產率及其二次代謝物含量超過原植株等優點 (Hamill & Lidgett 1997; Wielanek & Urbanek 1999)。目前丹參毛狀根培養已有數篇報告 (Chen *et al.* 2001; Ge & Wu 2005; Yan *et al.* 2005, 2006)，本研究室已建立其固態培養系統 (Lin 2005)，然對於將來大量繁殖所需的眾多參數卻未有相關報導，因此值得探討丹參毛狀根液態培養下參數與其丹參酮產量之關係，以作爲後續大量培養丹參毛狀根生產丹參酮之重要參考依據。本研究由比較丹參毛狀根最適培養基型式、接種部位與接種量的差異，藉以提高其生長效率與穩定性。此外，利用時序培養之因子調查，偵測毛狀根乾重、培養基碳、氮源消耗與丹參酮含量，可進一步瞭解其生長、養分吸收與二次代謝物累積的關係。

材料與方法

本研究利用丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 無菌瓶苗葉片經農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*, R1601) 感染所得之毛狀根爲材料 (Lin 2005)，將篩選所得高產之毛狀根系作爲試驗材料，切取其根尖 (長約 1.5 cm) 培養於含 3 %蔗糖之 B5 (Gamborg & Miller 1968) 固態培養基，於 25℃、無光照環境中進行培養，繼代培養週期爲 4 週。固態培養係於加入凝膠物質 (Difco Bacto-agar) 前先以 0.1–1 N NaOH 及 HCl 將 pH 值調至 5.7 ± 0.1，液態培養則不添加凝膠物質，而 pH 值調至 5.2 ± 0.1，培養基以 121℃、15 lb in^{-2} (1.05 kg cm^{-2}) 進行高溫高壓滅菌 15 min 後冷卻備用。固態培養係於毛狀根接種後置於 25 ± 1℃恆溫、黑暗環境靜置培養；液態培養則是於毛狀根接種後 25 ± 1℃恆溫、黑暗環境、轉速 80 rpm 之水平迴轉震盪器進行試驗。

利用固態培養 2 週之毛狀根根尖與根段作爲培植體，接種於固態與液態培養基比較其生長狀況，培養 8 週後稱其乾重；液態培養以每瓶接種 5 個根尖或根段，每處理 3 瓶爲 1 重複，進行 3 重複。固態培養處理爲內含 20 mL 培養基之塑膠培養皿 (90 mm × 15 mm, α plus，台灣) ，每處理

3 培養皿為 1 重複，進行 3 重複試驗。最佳接種量試驗係切取生長狀態良好之毛狀根尖 (長約 1.5–2 cm)，分別接種 5、10、15、20 條根尖於內含 20 mL 培養液之 125-mL 三角錐瓶進行試驗，培養 8 週後稱其乾重；每處理 3 瓶為 1 重複，進行 3 重複。生長時序觀測係切取 10 條毛狀根根尖 (約 0.03 g 鮮重) 接種於內含 20 mL 液態培養基之 125-mL 錐形瓶中進行培養，培養過程中每週取樣 3 瓶進行調查分析，項目包括毛狀根之乾重、培養液 pH 值、培養液中碳、氮源濃度以及毛狀根與培養液中內含之丹參酮類含量等。

毛狀根乾重調查係將毛狀根以濾紙將其表面水分吸乾後，置於 45–50℃烘箱中乾燥兩天，所得重量即為乾重。烘乾之毛狀根以適量萃取溶劑 [二氯甲烷 (dichloromethane)：甲醇 (methanol) = 1：4] 進行研磨萃取，經超音波震盪 20 min 後收集濾液，殘渣再加適量萃取溶劑再萃取 1 次。合併所得濾液並以真空減壓濃縮機 (EYELA，日本) 濃縮至乾，利用甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜 (Millipore，日本) 過濾，以 HPLC 法檢測丹參酮類之含量 (修改自 Chen *et al*. 2005)。利用液-液萃取法分析培養液中丹參酮類含量，方法為吸取適量培養液置於分液漏斗中，並加入同體積之乙酸乙酯 (Ethyl acetate)，經劇烈震盪後靜置至分層，取出有機層，隨後再以適量正己烷 (n-Hexane) 重複上述步驟；合併所得有機層以真空減壓濃縮機濃縮至乾，利用甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜過濾以供 HPLC 法檢測丹參酮類含量之用 (修改自 Chen & Chen 1999)。上述萃取分析所使用之溶劑，均使用 Merck (美國) 公司 LC 級試劑。

HPLC 法採用美商沃特斯公司相關儀器設備與軟體介面 (Waters，美國)；層析管柱為 RP-18, LiChroCART® 250-4 (5 μm, 4.6 × 250 mm) (Merck，美國)。在 30℃控溫條件下，以 Methanol：Tetrahydrofuran：Glacial Acetic Acid：H_2O = 18：35：1：46 (v/v) 為移動相 (Merck，美國)，流速 1 mL min^{-1}，檢測波長為 254 nm 進行丹參酮類含量分析 (修改自 Chen *et al*. 2005)。丹參酮Ⅰ(TanⅠ)、丹參酮ⅡA (TanⅡA) 與隱丹參酮 (Crypto) (九鼎生技，台灣) 之標準溶液配製濃度為 100、80、60、40 及 20 mg L^{-1}，在上述的層析條件下每次注射 10 μL進行測定，每個濃度重複 3 次，以求得線性迴歸方程式。丹參毛狀根及其培養液等樣品分別注射 10 μL濾液、重複注射 3 次，依所得線性迴歸方程式推算各樣品中 TanⅠ、TanⅡA 及 Crypto 含量。

培養液中蔗糖與葡萄糖濃度利用醣類快速分析儀 (YSI 2700 SELECT biochemistry analyzer, Yellow Springs，美國) 進行測試，儀器搭配蔗糖 (YSI 2703 membrane kit) 與葡萄糖 (YSI 2365 membrane kit) 酵素膜進行分析，取培養液 2 mL 經離心 (8000 rpm) 後，取上清液進行檢測。培養液中氨態氮 (ammonia nitrogen) 與硝酸態氮 (nitrate nitrogen) 分析係利用氮素自動分析儀 (Nitrogen Auto-analyzer, ALPKEM，美國) 進行偵測 (EPA-600/4-79-020 1984)。培養液中的硝酸態氮與氨態氮濃度係以硝酸鉀 (KNO_3，濃度 0–10 ppm) 與硫酸銨 [$(NH_4)_2SO_4$，濃度 0–100 ppm] 作為標準品，樣品分析時各取培養液 1 mL 經離心 (8000 rpm) 取上清液稀釋定量後，依上述方法進行檢測。

培養試驗中所得毛狀根之乾重、丹參酮含量，培養基之 pH 值、醣類及氮源含量與培養液中丹參酮濃度變化，取樣自同批培養之 3 個錐形瓶之毛狀根與培養液，並計算其平均值與標準偏差。試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著 ($p < 0.05$)，則利用 Least significant difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結 果

根尖與根段培植體培養對毛狀根生長與其丹參酮類含量之影響

利用毛狀根根尖與根段作爲培植體，分別以固態與液態培養 8 週後結果列於表 1，根尖與根段培植體在液態培養，分別可獲得毛狀根乾重爲 3.5 g L^{-1} 與 3.6 g L^{-1}，較固態培養之根間與根段乾重 2.3 g L^{-1} 與 2.5 g L^{-1} 爲高，根尖或根段培植體在同一型態培養基中之生質量差異並不顯著。當毛狀根培養達 8 週時，利用 HPLC 法分析其丹參酮類含量結果顯示，根尖與根段培植體在液態培養可獲得丹參酮類 (TanⅠ+ TanⅡA + Crypto) 含量分別爲 8.12 mg g^{-1} 與 5.43 mg g^{-1}，較固態培養所得之丹參酮類含量分別爲 2.10 mg g^{-1} 與 3.61 mg g^{-1} 爲高。就總產量而言，根尖培植體在液態培養可獲得丹參酮類產量 (生質量 × 含量) 爲 28.13 mg L^{-1}，較根段培植體處理之 19.81 mg L^{-1} 爲高。

毛狀根接種量對毛狀根生長與丹參酮類含量之影響

利用接種不同數目之毛狀根根尖測試錐形瓶培養最佳接種量，經過 4 週的培養後接種量高於 15 根尖試驗組間 (15 與 20 根尖) 的鮮重已無顯著變化，毛狀根乾重已達約 6.97–7.97 g L^{-1}，顯著高於 4.60 g L^{-1} 之 10 根尖處理組與 2.43 g L^{-1} 之 5 根尖處理組 (圖 1)。繼續培養達 8 週時，10 至 20 根尖處理組之毛狀根鮮重已達約 9.83–10.22 g L^{-1}，處理組間差異並不顯著，但顯著高於 6.93 g L^{-1} 之 5 根尖處理組。利用 HPLC 法分析培養達 8 週之毛狀根丹參酮類 (TanⅠ+ TanⅡA + Crypto) 含量結果顯示，10–20 根尖處理組可獲得約 14.72–14.89 mg L^{-1} 丹參酮類，較高於 5 根尖處理組之 10.57 mg L^{-1} (圖 1)。

影響毛狀根液態時序培養生長因子之調查

毛狀根於錐形瓶液態培養 10 週其鮮、乾重累積情形如圖 2A 所示，毛狀根培養初期生長較緩慢，但於培養 1 週後觀察到毛狀根之側根迅速增長，而後在第 2 週開始進入對數生長期 (exponential

表 1. 根尖與根段培植體於固態或液態培養對丹參毛狀根生長與丹參酮類含量之差異性比較

Table 1. Comparison of root tips and tip-free root segments of *Salvia miltiorrhiza* as inoculum on root growth and tanshinones production in liquid or solid culture [z]

Treatment	Root biomass (g dw. L^{-1})	Tanshinones (mg g^{-1})			
		Crypto [x]	Tan I [x]	Tan IIA [x]	SUM
Solid culture					
root-tip	4.76 ± 0.08 c [y]	1.14 ± 0.005 d	0.54 ± 0.013 d	0.42 ± 0.001 d	2.10 ± 0.008 d
root-segment	5.08 ± 0.03 b	1.96 ± 0.003 c	0.79 ± 0.004 c	0.86 ± 0 c	3.61 ± 0.002 c
Liquid culture					
root-tip	7.04 ± 0.07 a	2.48 ± 0.029 a	2.16 ± 0.054 a	2.18 ± 0.018 a	6.82 ± 0.102 a
root-segment	7.36 ± 0.09 a	2.11 ± 0.020 b	1.79 ± 0.054 b	1.53 ± 0.024 b	5.43 ± 0.049 b

[z] Liquid cultures (5 explants/20 mL B5 medium/flask) were placed on a shaker (80 rpm) for 8 weeks, 9 flasks/treatment. Solid culture (5 explants/20 mL B5 medium/Petri dish) were incubated at 25 ± 1℃ in dark for 8 weeks, 9 dishes/treatment.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

[x] Crypto = Cryptotanshinone, TanⅠ= tanshinoneⅠ, and Tan ⅡA = tanshinone ⅡA

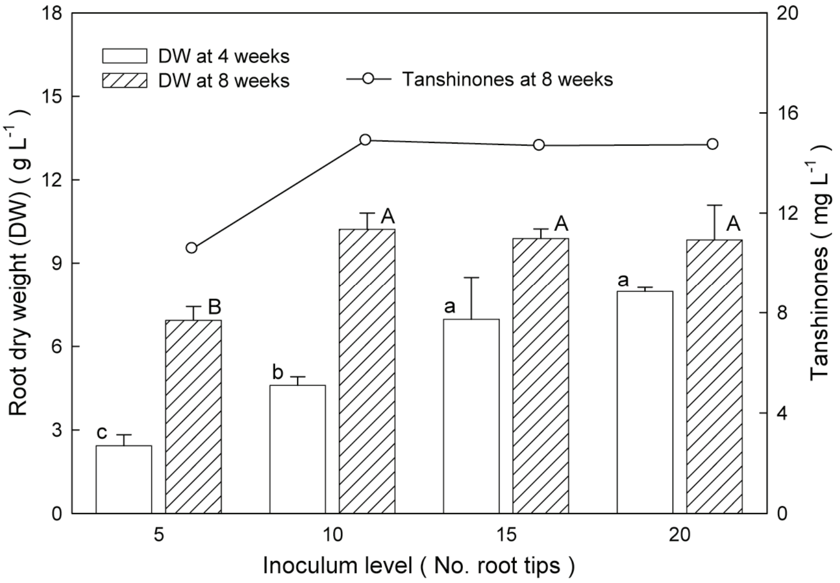

圖 1. 不同丹參毛狀根根尖接種數量對毛狀根生長與丹參酮類產量之差異性比較。

Fig. 1. Comparison of number of root tips of *Salvia miltiorrhiza* inoculated in B5 liquid medium on root growth and tanshinones production. Hairy root cultures (5, 10, 15, or 20 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at 25 ± 1℃ in dark for 4 and 8 weeks to determine root biomass and for 8 weeks to determine tanshinones (sum of Cryptotanshinone, tanshinone Ⅰ, and tanshinone ⅡA) production. The columns with same shade followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by LSD test.

phase)。在培養第 3 週後之毛狀根乾重增加趨勢減緩，於培養第 6 週時可達毛狀根最高乾重爲 5.8 g L^{-1}。計算毛狀根乾重增加速率之變化得知，毛狀根於培養第 3 週後之乾重增加速率已開始下降 (資料未列)，此時毛狀根生長狀態應屬於對數生長期的末期。

在時序培養過程中同時分析培養液中氮源 (NH_4^+與 NO_3^-)、碳源 (蔗糖與葡萄糖) 之濃度變化，結果顯示培養第 3 週時培養液中 NH_4^+濃度已降至初始濃度之 10%，而 NO_3^-濃度於培養過程中持續下降至培養第 6 週之生長停止期後，即呈現穩定的狀況 (圖 2B)。培養液中蔗糖與葡萄糖濃度隨之變化如圖 2C 顯示，蔗糖濃度隨毛狀根生長而快速下降，於培養第 3 週時之蔗糖濃度僅爲初始濃度之 13%；然而培養液中葡萄糖濃度在培養初期會隨著毛狀根生長而緩緩增加，在蔗糖濃度最低時 (培養第 3 週)，此時葡萄糖濃度上升至最高點約爲 1.72%，而後則穩定下降至培養第 10 週之 0.63%。培養液之 pH 值變化 (圖 2D) 在培養初期與對數生長期時，其值會隨毛狀根生長而下降至培養第 1 週之最低點 (pH 4.4)，而後隨即上升至 pH 4.9 (培養第 3 週)，其後維持在 4.8 與 4.9 間直至培養 10 週試驗終止。

毛狀根於錐形瓶液態培養下丹參酮的累積情形如圖 3 所示，毛狀根丹參酮的濃度在其生長進入定常期 (培養第 7 週) 後開始大量累積，此時毛狀根丹參酮產量約爲 15.8 mg L^{-1}，而培養第 8 週時，培養所得毛狀根之丹參酮產量可達 54.1 mg L^{-1}。此外，在錐形瓶培養過程中可發現培養液隨著培養

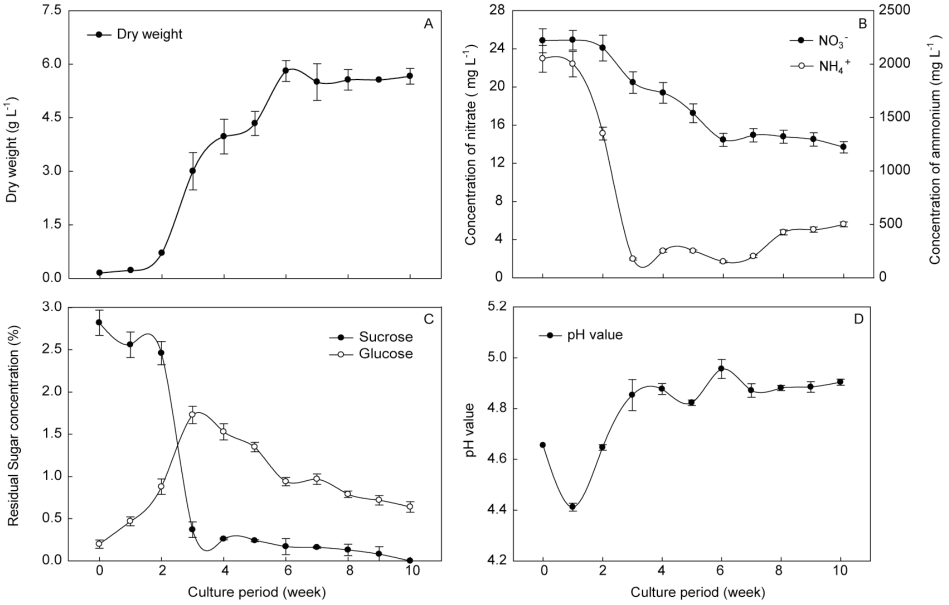

圖 2. 丹參毛狀根液態時序培養及其影響因子調查。毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之 (A) 乾重；(B) 培養液中氨態氮與硝酸態氮；(C) 培養液中蔗糖與葡萄糖及 (D) 培養液 pH 值的變化。

Fig. 2. Time-course study on factors affecting hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*: (A) root dry weight, (B) concentration of ammonium and nitrate in culture medium, (C) concentration of sucrose and glucose in culture medium, and (D) pH value of medium. Hairy root cultures, (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at 25 ± 1℃ in dark for 10 weeks.

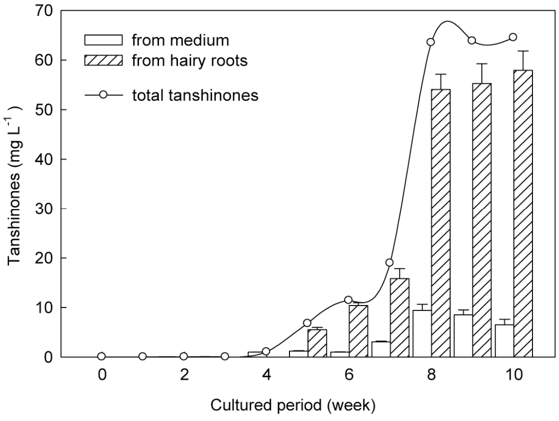

圖 3. 丹參毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之丹參酮類產量時序變化，丹參酮類分別萃取自毛狀根及培養液。

Fig. 3. Time-course study on tanshinones production of *Salvia miltiorrhiza* in liquid cultures. Tanshinones were extracted from hairy roots and culture medium of the cultures (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), placed on a shaker (80 rpm) and incubated at 25 ± 1℃ in dark for 0, 2, 4, 6, 8, and 10 weeks.

時間增加而漸呈紅褐色 (圖 4)，推測係培養過程中部分毛狀根之丹參酮外泌至培養液造成。利用液-液萃取方式分析培養液中丹參酮含量結果顯示，培養液中丹參酮量約爲總丹參酮量的 10–20%，在培養第 10 週時培養液中丹參酮量可達約 6.5 mg L^{-1}，此時每升培養之毛狀根與培養液丹參酮產量可達約 64.5 mg。

討　論

Hitaka *et al.* (2000) 於紅甜菜 (red beet, *Beta vulgaris* L. 'Detroit dark red') 毛狀根培養研究中指出，毛狀根之增生現象係藉由毛狀根延長 (elongation) 與側根形成等兩種機制所造成，而毛狀根所能生長的部位爲根尖 (root tip meristem) 部位，隨著毛狀根之延長及側根形成，可快速生長並累積生質量達到高密度培養。本研究結果並顯示，於毛狀根根段在接種後需經 1 週培養才會陸續長出側

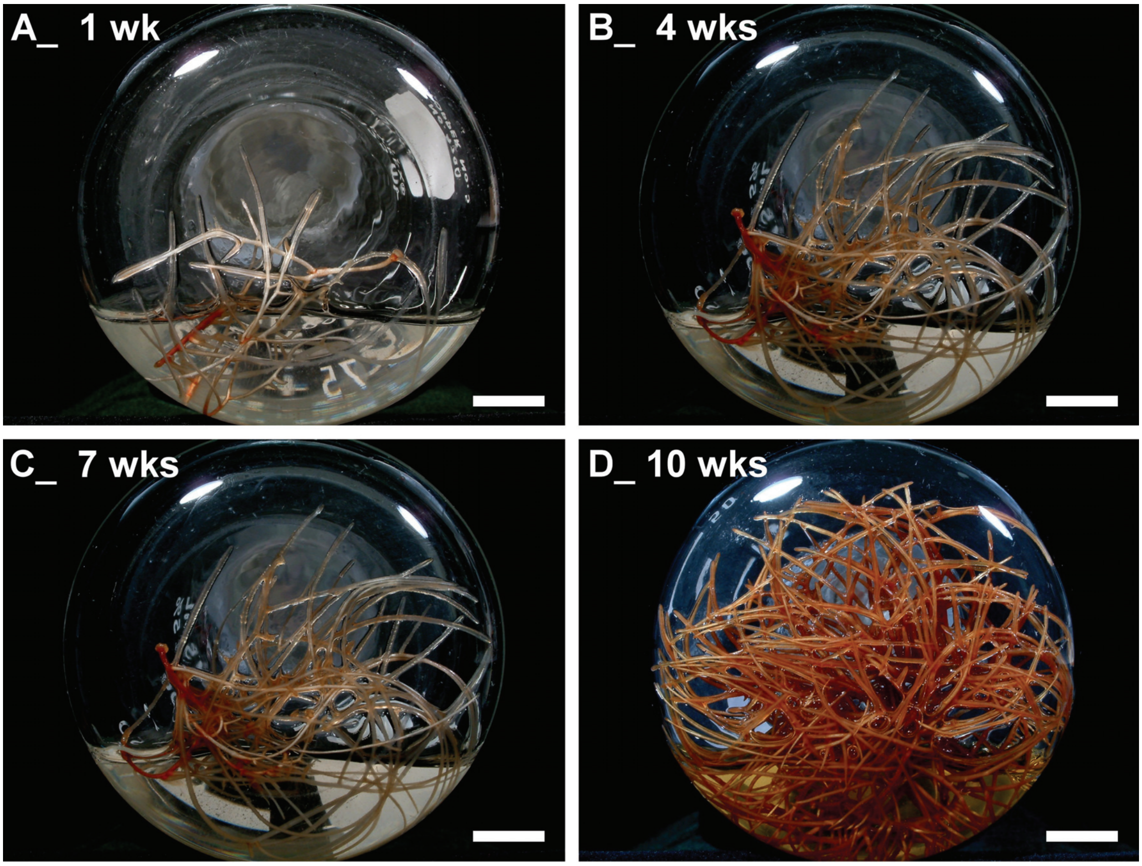

圖 4. 丹參毛狀根於 B5 液態培養基培養 10 週期間之生長及顏色變化情形。

Fig. 4. Growth and color of hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* in B5 medium for 1 (A), 4 (B), 7 (C), and 10 weeks (D). Hairy root cultures (10 root tips/20 mL B5 medium/flask), were placed on a shaker (80 rpm) at 25 ± 1℃ in dark for 1, 4, 7, and 10 weeks. Bar = 1 cm.

根，進而開始生長，顯示若在培養初期能直接接種根尖培植體，則可縮短毛狀根生長的適應期並可節省時間成本。此外，試驗結果亦顯示根尖培植體於液態培養中不僅生長狀況穩定，且可獲得較高之生質量與丹參酮類含量，因此後續試驗均以根尖培植體於液態培養條件下進行試驗。在眾多毛狀根培養文獻中少有針對毛狀根培植體的條件進行探討，然毛狀根之接種量，長度與根齡等因子之差異均會影響培養結果 (Mano *et al.* 1986; Sharp & Doran 1990)。丹參毛狀根培養試驗多以 0.3 g 鮮重培養於 40–50 mL 液態培養基的接種量進行試驗 (Chen *et al.* 2001; Yan *et al.* 2005, 2006)。本研究試驗結果顯示，利用鮮重僅 0.03 g 之 10 條丹參毛狀根尖，培養於含有 20 mL 之 125-mL 錐形瓶中進行試驗，此方式較其他高接種量處理所得之毛狀根的生長較穩定且均一，可做為後續丹參毛狀根培養基本條件。Han *et al*. (2004) 指出，利用毛狀根培養大量生產具經濟價值之二次代謝物系統，需要配合有效的擴大培養規模，以及後續產品純化與回收等流程，以達到經濟上的成本考量。然而，若依本研究試驗結果顯示，低接種量之培養效果雖較其他處理佳，但若後續丹參毛狀根大規模培養需有大量根尖時，則有其操作施行上仍有待進一步探討克服此困難。

Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根培養系統中，評估毛狀根生長過程中主要培養參數 (如 pH、碳源消耗、導電度、氮源濃度及生長速率) 間的關係，藉以探討促進毛根生長與二次代謝物產量之適當操作策略。本研究為尋求毛狀根培養所需之重要參數，建立提高丹參毛狀根生質量與丹參酮產量的培養策略，因此藉由錐形瓶液態培養方式進行毛狀根時序培養之因子調查，以瞭解毛狀根於液態培養中生長、養份吸收與二次代謝物的累積情形。針對丹參毛狀根生長而言，本研究鮮重約 0.03 g 之毛狀根於培養 6 週後可獲得最大的乾重為 5.8 g L^{-1}；然而，其他丹參毛狀根培養研究結果則顯示，其乾重分別為 14 g L^{-1} (接種量約 0.3 g fw. 40 mL^{-1}、培養 5 週) (Yan *et al.* 2005)、6 g L^{-1} (接種量約 0.3 g fw. 40 mL^{-1}、培養 3 週) (Yan *et al.* 2006) 與 4 g L^{-1} (接種量約 0.3 g fw. 50 mL^{-1}、培養 4 週) (Chen *et al.* 2001)，若考量最初之接種量差異達 10 倍而言，則顯示本研究之毛狀根生長效率顯著高於其他研究。若與其他毛狀根培養研究進行比較，顯著高於葫蘆巴 (*Trigonella foenum-graecum*) (Fernando *et al*. 2001) 毛狀根培養之 13 g L^{-1} (接種量約 0.1–0.2 g fw. 40 mL^{-1}、培養 5 週) ，但低於藜豆 (*Stizolobium hassjoo*) (Huang & Chou 2006) 毛狀根培養之 8.2 g L^{-1} (接種量約 0.006 g fw. 50 mL^{-1}、培養 3 週)；此外，本研究丹參毛狀根乾重累積至 6 週時達最大量，而後則不再累積乾重。因此本文作者推測，此毛狀根乾重累積的差異，除植物種類間毛狀根生長特性不同外，培養基養分不足是造成此差異的原因之一。

毛狀根液態培養系統中，除了其本身生長特性之因素會影響生質量外，培養基組成中碳源及氮源對於毛狀根生長影響亦甚鉅。Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根培養研究，在培養後期於培養液中分別添加原始濃度 1.5 倍的硝酸鉀 (KNO_3) 與原始濃度 1.5 倍的硫酸銨 [$(NH_4)_2SO_4$]，可增加其生質量達 16%與 28%，此結果顯示藜豆毛狀根生長受培養基氮源影響甚鉅。Shin *et al*. (2003) 利用紅甜菜毛狀根培養結果顯示，培養液中蔗糖濃度隨著紅甜菜毛狀根的生長而迅速下降，當培養液中蔗糖消耗殆盡時，毛狀根的生長則受到阻抑。根據本研究時序培養之相關數據顯示，丹參毛狀根生長於第 2 週後進入對數生長期 (圖 2A)，並於培養後第 6 週進入定常期 (stationary phase)，與一般細胞培養三個階段之生長曲線相符。在培養過程中分析培養液中氮源 (NO_3^-與 NH_4^+) (圖 2B) 及碳源 (蔗糖與葡萄糖) (圖 2C) 濃度變化得知，NH_4^+與蔗糖濃度於培養後第 3 週時已幾乎消耗殆盡，毛狀根開始以葡萄糖為其主要碳源，致使葡萄糖濃度持續下降，此時毛狀根之生長速率已開始減

緩，推測其原因可能與培養液中碳、氮源之養分受限有關。Shin *et al*. (2003) 研究指出，培養基初期的酸化現象 (acidification) 是 NH_4^+的消耗所致，而培養基酸化後之再鹼化作用，與培養液中 NH_4^+ 和 NO_3^-被吸收利用的先後順序有關。本研究結果顯示，丹參毛狀根培養第 3 週時培養液中 NO_3^-尚有約 1350 mg L^{-1}，而後隨毛狀根之生長而緩速下降，而當毛狀根生長進入定常期 (培養第 6 週) 時，NO_3^-濃度變化則趨減緩，此現象似乎顯示 NH_4^+較 NO_3^-易被丹參毛狀根所吸收利用。此外，本研究結果顯示培養液的酸化現象於培養的第 1 週內發生，pH 值由 4.7 降至 4.4，隨後又鹼化至 pH 值 4.8 (培養第 3 週)，而後則持續微量變化至培養後期之 pH 4.9 (圖 2D)。

Huang & Chou (2006) 於藜豆毛狀根研究結果指出，毛狀根培養至後期時添加硫酸銨，可促進左旋多巴胺 (L-3,4-二羥基苯氨酸, L-3,4-dihydroxy-phenylalanine, L-DOPA) 的產率。本研究結果顯示，當培養達第 6 週時，分析毛狀根與培養液之結果顯示，其三種主要丹參酮類產量僅約 11.4 mg L^{-1}，若繼續培養至第 8 週時則每升丹參酮類產量可達約 64 mg，但持續偵測至 10 週時未見其增加。Chen *et al.* (2001) 試驗結果指出，丹參毛狀根經 4 週培養後，其隱丹參酮 (Crypto) 產量僅達 0.04 mg L^{-1}，顯示此時毛狀根尚未開始累積丹參酮。Yan *et al.* (2005) 研究結果指出，在丹參毛狀根 60 天的培養過程中添加新培養液，可增進期生質量累積，但對於丹參酮含量反而降低，由 0.56 mg g^{-1}dw. (30 天) 降至 0.23 mg g^{-1} dw. (60 天)。然而，Zhang *et al.* (2004) 研究結果指出，丹參毛狀根培養過程中添加新培養液，對其生質量與丹參酮產量均有促進之效果。Hu & Alfermann (1993) 丹參毛狀根研究指出，當培養至第 12 天時調整蔗糖濃度爲起始濃度 (3%) 後，再繼續培養至第 20 天，可有效促進丹參酮類成分累積。此外，Lin (2005) 指出，6%蔗糖處理可獲得最大丹參酮單位含量與產量。因此，培養過程中進行培養基更新，對於丹參毛狀根確有促進之效果，但對於丹參酮累積則需進一步探討。針對丹參毛狀根培養之生質量累積與丹參酮產量間之關係而言，如何利用補充養分以持續提供丹參毛狀根生質量累積，並同時能夠累積二次代謝物的生產方式，將是未來研究探討的重點；此外，許多報告中亦提及添加誘引劑 (elicitors) 之處理，也是增產丹參酮的方法之一，期能在後續研究中尋求提高丹參毛狀根生質量與丹參酮產量的最適培養策略。

誌　　謝

本試驗研究承農委會農業生物技術國家型計畫經費補助 (NSC 95-2317-B-055-003、NSC 96-2317-B-055-007)，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

Caldas, E. D. and L. L. Machado. 2004. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. Food Chem. Toxicol. 42:599–603.

Chen U. C., J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2007. *In vitro* shoot acclimation and tanshinones analysis of *Salvia miltiorrhiza*. J. Agric. Res. Taiwan 56:21–30. (in Chinese with English abstract)

Chen, H. and F. Chen. 1999. Kinetics of cell growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. Biotechnol. Lett. 21:701–705.

Chen, H., F. Chen, C. K. Francis, C. K. Chiu, and M. Y. Lo. 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Enzyme Microb. Technol. 28:100–105.

EPA-600/4-79-020. 1984. Nitrogen Ammonia. Methods for Chemical Analysis of Water Wastes. Method 350.1, Storet No. Total 00610, dissolved 00608.

Fernando, P. L., R. M. Martha, A. C. Carlos, B. Jean-Marie, and C. C. Graciano. 2001. Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. J. Agric. Food Chem. 49:6012–6019.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.

Guo, B. L., Y. X. Feng, and Y. J. Zhao. 2002. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza*. China J. Chin. Mater. Med. 27:492–495. (in Chinese with English abstract)

Hamill, J. D. and A. J. Lidgett. 1997. Hairy root cultures: Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. p.1-29. *in*: Hairy Roots: Culture and Applications. (Doran, P. M., ed.) Harwood Academic. Australia.

Han, B., J. C. Linden, N. P. Gujarathi, and S. R. Wickramasinghe. 2004. Population balance approach to modeling hairy root growth. Biotechnol. Prog. 20:872–879.

Hitaka, Y., Y. Takahashi, M. Kino-oka, M. Taya, and S. Tone. 2000. Culture of red beet hairy roots by considering variation in sensitivity of tip meristems to hydraulic stress. Biochem. Eng. J. 6:1–6.

Hu, P., Q. L. Liang, G. A. Luo, Z. Z. Zhao, and Z. H. Jiang. 2005. Multi-component HPLC fingerprinting of radix *Salviae miltiorrhizae* and its LC-MS-MS identification. Chem. Pharm. Bull. 53:677–683.

Hu, Z. B., D. Liu, and A. W. Alfermann. 1999. Genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*. p.249-260. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 45 (Bajaj, Y. P. S., ed.) Transgenetic Medical Plants. Springer-Verlag, New York.

Huang, S. Y. and S. N. Chou. 2006. Elucidation of the effects of nitrogen source on proliferation of transformed hairy roots and secondary metabolite productivity in a mist trickling reactor by redox potential measurement. Enzyme Microb. Technol. 38:803–813.

Kim, Y. J., B. E. Wyslouzil, and P. J. Weathers. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 38:1–10.

Li, H. B., J. P. Lai, Y. Jiang, and F. Chen. 2002. Preparative isolation and purification of salvianolic acid B from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A 943:235–239.

Lin, J. F. 2005. Development of Hairy Root Transformation System and its Secondary Metabolites Production of *Salvia miltiorrhiza*. Thesis of National Chung Hsing Univ. Taichung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)

Mano, Y., S. Nobeshima, C. Matsui, and H. Ohkama. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy roots cultures of *Coptis japonica*. Agric. Biol. Chem. 50:2715–2722.

Nalawade, S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao, and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. Bot. Bull. Acad. Sin. 44:79–98.

Park, S., J. S. Song, D. K. Lee, and C. H. Yang. 1999. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth inhibition. Bull. Korean Chem. Soc. 20:925–928.

Roberts, S. C. and M. L. Shuler. 1997. Large-scale plant cell culture. Curr. Opin. Biotechnol. 8:154–159.

Saper, R. B., S. N. Kales, J. Paquin, M. J. Burns, D. M. Eisenberg, R. B. Davis, and R. S. Phillips. 2004. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. J. Am. Med. Assoc. 292:2868–2873.

SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Inst., Cary, NC, USA. 943 pp.

Sharp, J. M. and P. M. Doran. 1990. Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Biotech. 16:171–186.

Shin, K. S., D. Chakrabarty, J. Y. Ko, S. S. Han, and K. Y. Paek. 2003. Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. Plant Growth Regul. 39:187–193.

Wielanek, M. and H. Urbanek. 1999. Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57:39–45.

Wu, Y. J., C. Y. Hong, S. J. Lin, and M. S. Shiao. 1998. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:481–486.

Yan, Q., M. Shi, J. Ng, and J. Wu. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci. 170:853–858.

Yan, Q., Z. Hu, R. X. Tan, and J. Wu. 2005. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. J. Biotechnol. 119:416–424.

Zhang, C., Q. Yan, W. K. Cheuk, and J. Wu. 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag^{+} elicitation and nutrient feeding. Planta Med. 70:147–151.

Zhong, J. J. 2001. Biochemical engineering of the production of plantspecific secondary metabolites by cell suspension cultures. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 72:1–26.

Production of Tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in Hairy Root Culture[1]

Uei-Chern Chen[2], Hsiao-Sung Chan[4], Choi-Yi Lee[2], Chin-Yi Tsao[2], Jen-Chyi Liu[3], Yahn-Chir Lee[3], and Chi-Ni Hsia[2,5]

Abstract

Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, J. Y. Tsao, J. C. Liu, Y. C. Lee, and C. N. Hsia. 2008. Production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. J. Taiwan Agric. Res. 57:305–316.

Leaf explants of *Salvia miltiorrhiza* were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* strain R1601 to induce formation of hairy roots. Root cultures were established and maintained in a semi-solid or a liquid B5 medium. They were used to study effect of source of inoculum, size of inoculum, type of media and incubation period on production of root biomass and tanshinones in liquid culture. Results showed that root tips were superior to other root segments as inoculum for production of root biomass and tanshinones in liquid cultures. The treatments of 10, 15 and 20 root tips/20 mL B5 medium significantly increased root growth and production of tanshinones, compared to the treatment of 5 root tips/20 mL B5 medium. Concentration of sucrose and NH_4^+ in B5 liquid cultures rapidly reduced to 9% and 10%, respectively, in 3 weeks, resulting in a decrease in biomass accumulation. This indicates that carbohydrate and nitrogen might be important limiting factors for hairy root growth of *S. miltiorrhiza*. Production of dry weight biomass in liquid B5 medium peaked at 5.8 g L^{-1} after 6 weeks, whereas production of tanshinones peaked at 64 g L^{-1} after 8 weeks.

Key words: Danshen, *Salvia miltiorrhiza*, Time-course study, Nitrogen source, Carbohydrate source, Secondary metabolite, Tanshinones, Hairy root culture.

---

1. Contribution No.2339 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 21, 2008.
2. Respectively, Assistant Researcher, Contract Employee, Contract Employee, and Associate Researcher, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Assistant Researcher and Assistant Researcher, Agricultural Chemistry Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Assistant Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponding author, e-mail: chhsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04) 23302806.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(4):317–322 (2008)

稻米品質功能性標誌分析[1]

陳哲仁[2] 李長沛[2] 曾東海[2] 吳明哲[2,3]

摘　要

陳哲仁、曾東海、李長沛、吳明哲。2008。稻米品質功能性標誌分析。台灣農業研究 57:317–322。

水稻是台灣重要農作物之一，而良質米品種深受生產者及消費者所喜好，因此，稻米品質提昇是現行水稻育種的主要目標，特別是稻米的食味及外觀品質的改良。本實驗利用 7 個不同品質相關分子標誌，針對澱粉合成、香味以及穀粒長基因座進行調查，藉此瞭解國內栽培品種品質性狀的遺傳組成，結果顯示日本型及印度型水稻品種呈現兩種不同基因型組成，此外，在粒長 GS3 基因座發現新的對偶基因型，調查結果有助於利用水稻分子標誌輔助育種改良應用。

關鍵詞：水稻、品質、功能性標誌。

水稻是世界重要的糧食作物，產量、外觀及食味品質是栽培水稻重要特性，亦為水稻之重要育種目標。稻米主要由澱粉組成，其中直鏈性澱粉含量是品質的重要關鍵因子，水稻 *Wx* 基因座編譯 granule bound starch synthase (GBSS)，研究指出 *Wx* 基因插入子 1 (intron 1) 的 5 端 splice site (G/T) 單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 影響基因表現，導致直鏈性澱粉含量變化，其中 T allele 屬於低直鏈性澱粉 (15.8%)，G allele 則有較高的直鏈性澱粉含量 (28.2%)；另外，*Wx* 基因序列中 CT motif 重覆套數多寡也有影響，但是有多達 10 種對偶基因型，與直鏈性澱粉含量關連性不如 5 端 splice site G/T SNP 精確，兩者能解釋高達 9 成以上的直鏈性澱粉含量變化 (Ayres *et al*. 1997; Bao *et al*. 2006b)。此外，可溶性澱粉合成脢 (soluble starch synthase, SSS) 和澱粉支鏈脢 (starch branching enzyme, SBE) 等酵素也共同參與稻米澱粉生合成作用，分別調控直鏈性和支鏈性澱粉合成與組成比例，影響米飯食味品質，但是不同基因型對米飯品質確切的影響仍不明朗 (Bao *et al*. 2002, 2006a; Han *et al*. 2004; Liu *et al*. 2004)。米飯香味也是重要的品質特性，目前在 8 號染色體已鑑定出一個香味基因 *BADH2*，透過專一性引子 PCR 鑑定，可作為茉莉香米品種及育種雜交後裔篩選之用 (Bradbury *et al*. 2005)。稻米粒型也是品質重要環節直接影響消費者購買意願，粒長 *GS3*

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2338 號。接受日期：97 年 11 月 18 日。
2. 本所生技組聘用人員、助理研究員、副研究員及研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：wu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

基因位在 3 號染色體近中心 (pericentromeric) 位置，Fan 等人 (2006) 指出表現子 2 (exon 2) 序列中一個關鍵的 (C/A) SNP 是參試印度型水稻短粒型品種 (Chuan7, Zhenshan97) 與長粒型品種 (Minghui63, H94) 的區別，同時短粒對長粒是顯性。

不同的消費族群對稻米品質有不同的偏好，像是美國、中國以及多數的亞洲國家消費市場喜好印度型 (indica) 外型細長，烹煮後口感鬆散品種，台灣及日本則偏好日本型 (japonica) 中短粒型，米飯具光澤 Q 軟有嚼勁品種 (Fan *et al*. 2006; Ayres *et al*. 1997)。本研究針對澱粉合成酵素 (*Wx*、*SSI*、*SSIIa*、*SBE1*、*SBE3*)、香味 (*BADH2*) 以及穀粒長度 (*GS3*) 等 7 個不同基因座，根據已知序列及參考資料合成專一性引子 (表 1) (Ayres *et al*. 1997; Bao *et al*. 2002, 2006a; Bradbury *et al*. 2005; Fan *et al*. 2006; Han *et al*. 2004)，利用 PCR 方法配合 2% agarose 電泳分析 44 個國內外水稻品種品質相關基因型 (表 2)。部分無法直接從 PCR 擴增產物鑑別的基因型，將不同基因型序列上傳至 NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php)，分析可供鑑別之限制酵素，以此瞭解稻米品質相關基因在國內水稻育種方面的應用潛力。分析參試水稻品種發現日本型水稻澱粉合成酵素整體的基因型組成大致為 Wx (SNP) T allele、SS1 (SSR)-199 bp、SBE1 (STS)-882 bp 及 SBE3 (SNP) G allele；印度型水稻 Wx (SNP) G allele、SS1 (SSR)-202 bp、SBE1 (STS)-548 bp 及 SBE3 (SNP) C allele (表 2)，符合前人研究顯示印度型通常有較高的直鏈性澱粉含量和糊化溫度，以及水稻不同亞種 *SBE1* 和 *SBE3* 基因型歧異 (Bao *et al*. 2002; Liu *et al*. 2004)。此外，澱粉合成基因 *SSIIa* 在小麥基因功能性研究指出與支鏈性澱粉的細微結構有關 (Konik-Rose *et al*. 2007)，Bao 等人 (2006a) 則指出 *SSIIa* 基因 GC/TT 多型性，能作為中高與低糊化溫度的區別，因此與米飯質地有關。*Wx* 基因 G/T SNP 一般是用 *Acc*I 限制酵素 (辨識序列 GT A/C G/T AC) 加以區分 (Ayres *et al*. 1997; Bao *et al*. 2006b)，本試驗發現限制酵素 *Bst*Z17I (辨識序列 GTATAC) (NEB，美國) 能有相同的效果，並且具有序列辨識專一性及單位酵素價格約 *Acc*I 限制酵素二分之一的優點。Bradbury 等人 (2005) 發現茉莉香米品種 Basmati 和 Jasmine 的 *BADH2* 基因中 8-bp 缺失造成功能喪失，導致香味成分 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) 的累積。利用可鑑別的 PCR 引子，並以 Basmati 370 和 Jasmine 品種 PCR 增幅後的電泳圖譜為對照，在國內品種中發現台中秈糯 1 號 (TCSW1) 和台秈糯 2 號 (TSW2) 也有此一缺失，台秈糯 2 號是具有淡香的香米品種，根據親緣譜系得知香味特性可能是從台中秈糯 1 號獲得，而與 *BADH2* 基因有關；國內新育成台農 71 號 (TNG71) 和桃園 3 號 (TY3) 具有芋頭香味，兩者 *BADH2* 基因都不具 8-bp 缺陷，顯示芋頭香味受其他基因控制。近期的研究顯示許多南亞及東南亞的香米品種也累積大量的 2AP，但是 *BADH2* 基因並沒有 8-bp 缺失，推測應有其他香味基因存在 (Fitzgerald *et al*. 2008)。本試驗針對穀粒長 *GS3* 基因設計專一性引子涵蓋表現子 2 (C/A) SNP，並利用限制酵素 *Pst*I 轉換成易於分析的 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 標誌，發現如下 3 個 CAPS 基因型：(A) 日本晴 (Nipponbare) 及台農 67 號 (TNG67) 為代表，屬日本型；(B) 93-11 及 IR64 為代表，屬印度型；(C) 台中在來 1 號 (TN1) 及台中秈 10 號 (TCS10) 為代表，屬印度型。$GS3^c$ 基因型外表型性狀屬長粒型，解序發現表現子 2 是 C allele，且插入子 2 有 50-bp 插入片段 (未公開資料)，因此推測表現子 2 (C/A) SNP 並非粒長唯一關鍵性差異，而國內參試秈稻品種都是 $GS3^c$ 基因型，可能的原因還需要進一步地試驗及討論。利用 IR64 × TNG67 F_2 分離族群已初步證實，Wx(SNP)*Bst*Z17I 和 GS3(SNP)*Pst*I 標誌可輔助選拔高低直鏈性澱粉及篩選穀粒長短 (表 3)，顯示分子標誌有助於選拔效率提升。提升稻米品質一直是育種工作的重要目標，但傳

表 1. 稻米品質 SSR、SNP 以及 STS 分子標誌引子序列

Table 1. The primer sequences used to amplified SSR, SNP and STS markers in grain quality genes

Marker		Primer (5' → 3')	Allele	Ch	Reference
Starch synthesis					
Wx(SSR)	F	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	106–214 bp [z]	6	Ayres *et al*. 1997
	R	TTGCAGATGTTCTTCCTGATG			
Wx(SNP)*Bst*Z17I	F	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	G/T [y]		
	W2R	TTTCCAGCCCAACACCTTAC			
SSI	F	GATCCGTTTTTGCTGTGCCC	195, 199, 202, 218 bp [z]	6	Bao *et al*. 2002
	R	CCTCCTCTCCGCCGATCCTG			
SSIIa	F7	CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC	GC/TT [x]	6	Bao *et al*. 2006a
	F22	CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC			
	R1	GCCGGCCGTGCAGATCTTAAC			
	R21	ACATGCCGCGCACCTGGAAA			
SBE1(STS)	F	GAGTTGAGTTGCGTCAGATC	I/J [w]	6	Han *et. al*. 2004
	R	AATGAGGTTGCTTGCTGCTG			
SBE3(SNP)*Spe*I	F	GTCTTGGACTCAGATGCTGGACTC	G/C [v]	2	Han *et. al*. 2004
	R	ATGTATAACTGGCAGTTCGAACGG			
Appearance					
GS3(SNP)*Pst*I	F500	TCCGTTTTAATTAGCACCAT	A/B/C [u]	3	Fan *et al*. 2006
	R500	TACTTTCATTTGCCAAGGTT			
Fragrance					
BADH2	ESP	TTGTTTGGAGCTTGCTGATG	F/NF [t]	8	Bradbury *et al*. 2005
	IFAP	CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC			
	INSP	CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA			
	EAP	AGTGCTTTACAAAGTCCCGC			

[z] Amplified fragments estimated by eGene capillary electrophoresis system model HDA-GT12™.
[y] G: AGGTATAC; T: AGTTATAC.
[x] GC: GGGCTC; TT: GGTTTC.
[w] J: *japonica*, 882 bp; I: *indica*, 548 bp.
[v] G: ACTAGT; C: ACTACT.
[u] A: CTGCAG; B: CTGAAG; C: CTGCAG, containing 50-bp insertion.
[t] F: 257 bp; NF: 355 bp.

統的育種方法，評估的準確性易受環境因素影響，以及必須在後期固定世代才能獲得同質材料，再進行相關性狀調查分析，因此透過前述的功能性核酸多型性 (functional nucleotide polymorphism, FNP) 分析結果可知，應用分子標誌可在世代早期即進行優良基因型選拔，特別有助於育種效率提昇。依據目前對國內外文獻搜尋結果，並未找到任何綜合分析所有已知米質相關基因型的研究工作，本試驗篩及改良現有之品質分子標誌，也設計 GS3 粒長基因座分子標誌，並發現新的對偶基因型，將利用此一基礎訊息作爲稻米品質分子標誌輔助育種改良，以及深入探討 *SSI*、*SBE1* 與 *SBE3* 等澱粉生合成基因對米質的影響。

表 2. 水稻栽培品種 *Wx*、*SSI*、*SSIIa*、*SBE1*、*SBE3*、*BADH2* 以及 *GS3* 基因型分析

Table 2. Genotyping of *Wx*, *SSI*, *SSIIa*, *SBE1*, *SBE3*, *BADH2* and *GS3* genes in rice cultivars

	Starch synthesis						Fragrance	Grain length
Cultivar	Wx(SSR)	Wx(SNP)-*Bst*Z17I	SSI	SSIIa	SBE1(STS)	SBE3(SNP)-*Spe*I	BADH2	GS3
TK1	118 bp	T [z]	199 bp	GC [z]	J [z]	G [z]	NF [z]	A [z]
TK2	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK3	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK4	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK5	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK6	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK7	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK8	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK9	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK10	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK11	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TK12	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK13	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK14	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK15	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TK16	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK17	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG67	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG68	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG69	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG70	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG71	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG72	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNGW73	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TCS10	120 bp	T	199 bp	TT	I	C	NF	C
TY1	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TY3	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TT30	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
Koshihikari	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
Nipponbare	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TCSW1	122 bp	T	202 bp	TT	I	G	F	C
TSW2	122 bp	T	202 bp	TT	I	G	F	C
TNGSW2	118 bp	T	202 bp	TT	I	C	NF	C
TN1	106 bp	G	202 bp	TT	I	G	NF	C
IR64	118 bp	G	199 bp	GC	I	C	NF	B
IR24	107 bp	G	202 bp	TT	I	C	NF	C
IR28	106 bp	G	202 bp	TT	I	C	NF	B
IR5105	118 bp	T	213 bp	TT	I	C	F	B
93-11	120 bp	T	202 bp	TT	I	C	NF	B
Jasmine	118 bp	T	202 bp	TT	I	C	F	B
Basmati 370	118 bp	G	195 bp	GC	I	G	F	B
Milfor	124 bp	G	199 bp	GC	I	G	F	B
KDML105	118 bp	T	218 bp	TT	I	C	F	B
Mudgo	104 bp	G	218 bp	GC	I	G	NF	C

[z] Allele characteristics as listed in Table 1.

表 3. 水稻 IR64 × TNG67 F_2 子代不同 *Wx* 及 *GS3* 基因型直鏈性澱粉和粒長平均值

Table 3. Mean value of amylose content and grain length of different genotypes at *Wx* and *GS3* loci in rice F_2 progeny derived from IR64 × TNG67

	Parent (mean ± SD)		Homozygous for TNG67 allele		Homozygous for IR64 allele		TNG67 / IR64 Heterozygous	
Trait	TNG67	IR64	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Amylose content (%)	19.20 ± 0.82	23.10 ± 0.72	15.37 ± 2.2	12.00–17.8	22.34 ± 2.3	19.80–24.3	22.18 ± 1.9	15.60–24.8
Grain length (mm)	7.22 ± 0.13	9.67 ± 0.63	8.38 ± 0.52	7.34–8.93	8.89 ± 0.49	7.68–10.21	8.23 ± 0.69	6.63–9.87

引用文獻 (Literature cited)

Ayres, N. M., A. M. McClung, P. D. Larkin, H. F. Bligh, C. A. Jones, and W. D. Park. 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor. Appl. Genet. 94:773–781.

Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2002. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 105:898–905.

Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2006a. Nucleotide diversity in *starch synthase IIa* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 113:1171–1183.

Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2006b. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 113:1185–1202.

Bradbury, L. M., R. J. Henry, Q. Jin, R. F. Reinke, and D. L. Waters. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Mol. Breed. 16:279–283.

Fan, C., Y. Xing, H. Mao, T. Lu, B. Han, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 2006. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. Theor. Appl. Genet. 112:1164–1171.

Fitzgerald, M. A., N. R. Sackville Hamilton, M. N. Calingacion, H. A. Verhoeven, and V. M. Butardo. 2008. Is there a second fragrance gene in rice? Plant Biotechnol. J. 6:413–423.

Han, Y., M. Xu, X. Liu, C. Yan, S. S. Korban, X. Chen, and M. Gu. 2004. Genes coding for starch branching enzymes are major contributors to starch viscosity characteristics in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 166:357–364.

Konik-Rose, C., J. Thistleton, H. Chanvrier, T. Tan, P. Halley, M. Gidley, B. Kosar-Hashemi, H. Wang, O. Larroque, J. Ikea, S. McMaugh, A. Regina, S. Rahman, M. Morell, and Z. Li. 2007. Effects of starch synthase IIa gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat. Theor. Appl. Genet. 115:1053–65.

Liu, X., M. Gu, Y. Han, Q. Ji, J. Lu, S. Gu, R. Zhang, X. Li, J. Chen, S. S. Korban, and M. Xu. 2004. Development gene-tagged molecular markers for functional analysis of starch-synthesizing genes in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 135:345–353.

Genetic Analysis of Rice Grain Quality Traits Using Functional Markers[1]

Jen-Ren Chen[2], Charng-Pei Li[2], Tung-Hai Tseng[2], and Min-Tze Wu[2,3]

Abstract

Chen, J. R., C. P. Li, T. H. Tseng, and M. T. Wu. 2008. Genetic analysis of rice grain quality traits using functional markers. J. Taiwan Agric. Res. 57:317–322.

Rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in Taiwan and quality rice varieties are preferable by producers and consumers. Hence, improvement of rice quality is a major objective in current breeding program, especially in appearance, cooking and eating quality. In this study, seven functional markers related to loci of starch synthesis, fragrance and grain length were surveyed to reveal the genetic basis of grain quality traits in rice cultivars grown in Taiwan. Results showed diversities of starch synthesis gene between japonica and indica subspecies of rice. Moreover, a new allele at GS3 locus was found. These findings are useful in rice breeding for quality improvement via marker-assisted selection.

Key words: Rice, *Oryza sativa*, Grain quality, Functional markers.

---

1. Contribution No.2338 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 18, 2008.
2. Respectively, Contract Employee, Assistant Research, Associate Researcher, and Senior Researcher and Head, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding auther, e-mail: wu@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

台灣農業研究

第五十七卷　目　次

第一期

研究報告

廖吉彥、胡仲祺 張清安、鄧汀欽	台灣鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1 之初步鑑定	1
陸龍虎、蔡致榮 向為民、徐武煥 莊秋彰	火鶴花自動肥灌與遠端即時監控系統之研究	15
鄭統隆、施怡如 曾東海、賴永昌 吳明哲	甘藷花青素與多酚含量之研究	33
簡宣裕、石信德 林俊義、張明暉 劉邦基	抗輪點病毒轉基因木瓜之生態影響評估 I. 土壤微生物族群數與有效性養分濃度的差異	49
黃毓斌、高靜華 江明耀、鄭　允 李木川	東方果實蠅小面積區域防治模式研究 (二) 柑橘園之測試	63
顏財發、林永順 羅婉容	高屏地區農產品批發市場關係品質的前因與結果	74

第二期

研究報告

謝光照	玉米花粉直感效應對籽粒重與果皮性狀表現之影響	85
陳烈夫、吳明哲 呂秀英	植酸酵素基因轉殖馬鈴薯收穫田區之殘株管理－浸水處理評估	95
呂秀英、陳政道 呂椿棠、邱怡嘉 魏夢麗	水稻表現序列標幟 (EST) 功能分析自動化系統	103
陳威臣、夏奇鈮 葉茂生、曹進義 蔡新聲	培養基組成分對高氏柴胡癒合組織增殖與柴胡皂苷含量之影響	119
溫宏治、劉政道	台灣高屏地區玉荷苞荔枝害蟲種類、危害調查與果實套袋試驗	133
洪士程、何坤耀 陳健忠	嘉義地區荔枝園荔枝細蛾與東方果實蠅危害調查	143

第三期

研究報告

謝光照	台南白玉米籽粒重及果皮性狀之遺傳分析	153
魏夢麗、鍾依涵 呂椿棠、呂秀英	水稻白葉枯病抗性基因之蛋白質胺基酸組成的多變數分析	161
曾清山、吳明哲 黃鴻章、賴明信 陳治官	轉殖植酸酵素基因水稻之農藝性狀及田間生物安全性評估	175
蕭翌柱、廖俊旺 吳明哲	台灣金線連生技產品之毒理安全性評估 I. 台灣金圓酒對大鼠之口服急毒性試驗	183
卓緯玄、陳治官 賴明信、顏信沐 曾東海、顏宏真	水稻秧苗期耐鹽性之篩選技術	193
薛百祺、唐佳惠 李堂察	採收方式對鳳梨果實內部褐變之影響	205
李文立、邱國棟 林榮貴、陳福旗	愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖	213

第四期

研究報告

溫英杰、張靜誼 高建元	阿里山山櫻遺傳多樣性之研究	233
楊淑惠、陳鯤兆 吳昭慧、廖俊旺	銀耳多醣產品毒理及致突變性評估	243
江秀娥、楊世華 潘德芳	德國消費者對台灣椪柑消費偏好之研究	256
林信成、張　翔 曾國欽	台灣柑橘潰瘍病菌新菌株之特性分析	265
賴永昌、李忠田 鄭統隆、蔡武雄	甘藷新品種台農 73 號之育成	279
羅淑芳、郭昭麟 陳宗禮、蔡新聲	台灣銅皮石斛的種子發芽及大量繁殖	295
陳威臣、詹效松 李秋儀、曹進義 劉禎祺、李艷琪 夏奇鋌	丹參毛狀根培養建立與其丹參酮含量之研究	305

研究簡報

陳哲仁、曾東海 李長沛、吳明哲	稻米品質功能性標誌分析	317

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Contents of volume 57

Number 1

Research Reports

Jye-Yann Liao, Chung-Ci Hu, Chin-An Chang, and Ting-Chin Deng	The Preliminary Identification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 on Pineapple in Taiwan	1
Lung-Hu Lu, Jyh-Rong Tsay, Wei-Ming Hsiang, Wu-Huann Shyu, and Keng-Chang Chuang	Studies on Automated Fertigation and Remote Monitoring Control System for Anthurium Flowers	15
Toong-Long Jeng, Yi-Ju Shih, Tong-Hai Tseng, Yung-Chang Lai, and Min-Tze Wu	Studies on Anthocyanidin and Total Phenolic Contents of Sweet Potato	33
Shiuan-Yuh Chien, Hsin-Der Sih, Chien-Yih Lin, Ming-Hui Chang, and Pan-Chi Liuo	Environmental Safety Assessment of Transgenic Virus Resistant Papaya I. The differences of soil microbial population and available nutrients concentration	49
Yu-Bing Huang, Ching-Hua Kao, Ming-Yao Chiang, Edward Y. Cheng, and Mu-Chuan Lee	Studies on Small Model Area-wide Control of the Oriental Fruit Fly for Citrus	63
Tsai-Fa Yen, Yeong-Shenn Lin, and Wan-Jung Lo	Antecedents and Consequences of Relationship Quality in Farm Wholesaler Markets in Kaohsiung and Pingtung Area	74

Number 2

Research Reports

Guang-Jauh Shieh	Xenia Effect on the Kernel Weight and Pericarp Characters of Maize	85
Lit-Fu Chen, Min-Tze Wu, and Hsiu-Ying Lu	Effect of Flooding on Management of Phytase-Containing Potato Tubers in the Harvested Field	95
Hsiu-Ying Lu, Cheng-Tao Chen, Chun-Tang Lu, Yi-Chia Chiu, and Meng-Li Wei	Rice Expressed Sequence Tag (EST) Automated Functional Analysis System	103
Uei-Chern Chen, Chi-Ni Hsia, Mau-Shing Yeh, Chin-Yi Tsao, and Hsin-Sheng Tsay	Influence of Medium Components on Callus Proliferation and Saikosaponin Content of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang	119
Hung-Chich Wen and Tsung-Dao Liou	Insect Pests and Their Injuries on Yuh-heh-bau Litchi and Effect of Fruit Bagging in Kao-Ping Area of Taiwan	133
Shi-Cheng Hung, Kun-Yaw Ho, and Chien-Chung Chen	Investigation of Fruit Damages of Litchi Caused by *Conopomorpha sinensis* Bradley and *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Chiayi	143

Number 3

Research Reports

Guang-Jauh Shieh	Diallel Analysis of Kernel Weight and Pericarp Characters in Tainan-White Maize (*Zea mays* L.) Population	153
Meng-Li Wei, Yi-Han Chung, Chun-Tang Lu, and Hsiu-Ying Lu	Multivariate Analysis of Amino Acid Composition in Proteins from Rice Bacterial Blight Resistance Genes	161
Ching-Shan Tseng, Min-Tze Wu, Hung-Chang Huang, Ming-Hsing Lai, and Chyr-Guan Chern	Field Assessment of Agronomic Performance and Biosafety of Phytase-gene Transformed Rice	175
Yih-Juh Shiau, Jiunn-Wang Liao, and Min-Tze Wu	Risk Assessment of the Bioproduct of *Anoectochilus formosanus* Hayata I. Acute Toxicity of the Taiwan Jin-Yuan Wine in Rats	183
Woei-Shyuan Jwo, Chyr-Guan Chern, Ming-Hsin Lai, Hsin-Mu Yen, Tung-Hai Tseng, and Hungchen Emilie Yen	Screening Technique for Salt Tolerance in the Rice Seedling Stage	193
Pai-Chi Syue, Chia-Hui Tang, and Tan-Cha Lee	Studies on Fruits Internal Browning of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) by Harvest Method	205
Wen-Li Lee, Kuo-Dung Chiou, Rong-Quey Lin, Fure-Chyi Chen	Cloning of Phytoene Desaturase Gene in Mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and Its Expression at Different Stages of Fruit Development	213

Number 4

Research Reports

Ien-Chie Wen, Ching-Yi Chang, and Chien-Yuan Kao	Study on the Genetic Diversity of *Prunus transarisanensis* Hayata	233
Shu-Hui Yang, Kun-Chao Chen, Jhaol-Huei Wu, and Jiunn-Wang Liao	Evaluation for Toxicology and Mutagenicity of *Tremella* Polysaccharide Extracted from *Tremella fuciformis*, Berk	243
Hsiu-E Chiang, Shi-Hua Yang, and Te-Fang Pan	A Study on Germany Consumers' Preferences for Taiwan Ponkan	256
Hsin-Cheng Lin, Hsiang Chang, and Kuo-Ching Tzeng	Characterization of Novel Strains of Citrus Canker Bacterium from Citrus in Taiwan	265
Yung-Chang Lai, Zhong-Tian Li, Toong-Long Jeng, and Wu-Hsiung Tsai	Breeding of the New Sweet Potato Variety, Tainung No. 73	279
Shu-Fang Lo, Chao-Lin Kuo, Chung-Li Chen, and Hsin-Sheng Tsay	*In Vitro* Seed Germination and Mass Propagation of *Dendrobium moniliforme*, a Native Species in Taiwan	295
Uei-Chern Chen, Hsiao-Sung Chan, Choi-Yi Lee, Chin-Yi Tsao, Jen-Chyi Liu, Yahn-Chir Lee, and Chi-Ni Hsia	Production of Tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in Hairy Root Culture	305

Research Notes

Jen-Ren Chen, Charng-Pei Li, Tung-Hai Tseng, and Min-Tze Wu	Genetic Analysis of Rice Grain Quality Traits Using Functional Markers	317

台 灣 農 業 研 究

作者索引

石信德	49
向爲民	15
江秀娥	256
江明耀	63, 143
吳明哲	33, 85, 175, 183, 317
吳昭慧	243
呂秀英	85, 103, 161
呂椿棠	103, 161
李文立	213
李木川	63
李忠田	279
李長沛	317
李秋儀	305
李堂察	205
李艷琪	305
卓緯玄	193
林永順	74
林信成	265
林俊義	49
林榮貴	213
邱怡嘉	103
邱國棟	213
施怡如	33
洪士程	143
胡仲祺	1
唐佳惠	205
夏奇鋸	119, 305
徐武煥	15
高建元	233
高靜華	63
張明暉	49
張清安	1
張翔	265
張靜誼	233
曹進義	119, 305
莊耿彰	15
郭昭麟	295
陳宗禮	295
陳治官	175, 193
陳威臣	119, 305
陳政道	103
陳哲仁	317
陳烈夫	85
陳健忠	143
陳福旗	213
陳鯤兆	243
陸龍虎	15
曾東海	33, 193, 317
曾國欽	265
曾清山	175
黃毓斌	63
黃鴻章	175
楊世華	256
楊淑惠	243
溫宏治	133
溫英杰	233
葉茂生	119
詹効松	305
廖吉彥	1
廖俊旺	183, 243
劉邦基	49
劉政道	133
劉禎祺	305
潘德芳	256

蔡武雄 279
蔡致榮 15
蔡新聲 119, 295
鄭允 63
鄭統隆 33, 279
鄧汀欽 1
蕭翌柱 183
賴永昌 33, 279
賴明信 175, 193
薛百褀 205
謝光照 85, 153
鍾依涵 161
簡宣裕 49
顏宏真 193
顏信沐 193
顏財發 74
魏夢麗 103, 161
羅婉容 74
羅淑芳 295

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Authors Index

Chan, Hsiao-Sung	305
Chang, Chin-An	1
Chang, Ching-Yi	233
Chang, Hsiang	265
Chang, Ming-Hui	49
Chen, Kun-Chao	243
Chen, Cheng-Tao	103
Chen, Chien-Chung	143
Chen, Chung-Li	295
Chen, Fure-Chyi	213
Chen, Jen-Ren	317
Chen, Lit-Fu	95
Chen, Uei-Chern	119, 305
Cheng, Edward Y.	63
Chern, Chyr-Guan	175, 193
Chiang, Hsiu-E	256
Chiang, Ming-Yao	63
Chien, Shiuan-Yuh	49
Chiou, Kuo-Dung	213
Chiu, Yi-Chia	103
Chuang, Keng-Chang	15
Chung, Yi-Han	161
Deng, Ting-Chin,	1
Hsia, Chi-Ni	119, 305
Hsiang, Wei-Ming	15
Hu, Chung-Ci,	1
Huang, Hung-Chang	175
Huang, Yu-Bing	63
Jeng, Toong-Long	33, 279
Jwo, Woei-Shyuan	193
Kao, Chien-Yuan	233
Kao, Ching-Hua	63
Ho, Kun-Yaw	143
Kuo, Chao-Lin	295
Lai, Ming-Hsin	193, 175
Lai, Yung-Chang	33, 279
Lee, Choi-Yi	305
Lee, Mu-Chuan	63
Lee, Tan-Cha	205
Lee, Wen-Li	213
Lee, Yahn-Chir	305
Li, Charng-Pei	317
Li, Zhong-Tian	279
Liao, Jiunn-Wang	183, 243
Liao, Jye-Yann	1
Lin, Chien-Yih	49
Lin, Hsin-Cheng	265
Lin, Rong-Quey	213
Lin, Yeong-Shenn	74
Liu, Jen-Chyi	305
Liuo, Pan-Chi	49
Lo, Shu-Fang	295
Lo, Wan-Jung	74
Lu, Chun-Tang	103, 161
Lu, Hsiu-Ying	95, 103, 161
Lu, Lung-Hu	15
Pan, Te-Fang	256
Shiau, Yih-Juh	183

Hung, Shi-Cheng	143
Shieh, Guang-Jauh	85, 153
Shih, Yi-Ju	15
Shyu, Wu-Huann	15
Sih, Hsin-Der	49
Syue, Pai-Chi	205
Tang, Chia-Hui	205
Tsai, Wu-Hsiung	279
Tsao, Chin-Yi	119, 305
Tsay, Hsin-Sheng	119, 295
Tsay, Jyh-Rong,	15
Tseng, Ching-Shan	175
Tseng, Tong-Hai	33, 193, 317
Liou, Tsung-Dao	133
Tzeng, Kuo-Ching	265
Wei, Meng-Li	103, 161
Wen, Hung-Chich	133
Wen, Ien-Chie	233
Wu, Jhaol-Huei	243
Wu, Min-Tze	33, 85, 175, 183, 317
Yang, Shi-Hua	256
Yang, Shu-Hui	243
Yeh, Mau-Shing	119
Yen, Hsin-Mu	193
Yen, Hungchen Emilie	193
Yen, Tsai-Fa	74

台 灣 農 業 研 究

關鍵詞索引

Ames 試驗	243
Logit 模型	256
Perl 語言	103
pthA 基因	265
Xa 基因	161
二次代謝物	119, 305
八氫茄紅素去氫酶	215
口服急毒性	243
口服急毒性試驗	183
土壤有效性養分	49
土壤微生物族群數	49
大量繁殖	295
大鼠	183, 243
小面積模式	63
丹參	305
公平性	74
木瓜抗輪點病毒	49
水稻	103, 161, 175, 193, 317
火鶴花	15
功能性標誌	317
功能註解及分類	103
台南白	5
台農 67 號突變品系	193
台灣金線連	183
玉米	153
玉荷苞荔枝	133
甘藷	33, 279
危害	143
多酚	33
多酚氧化酶	205
多醣	243
安全性評估	183
自動化系統	103
自動肥灌	15
即時	15
序列比對	1
抗氧化活性	33
沙門菌株	243
芒果	215
東方果實蠅	63, 143
果皮	153
果皮含量	85
果皮厚度	85
果實套袋防治	133
花青素	33, 279
花粉直感	85
表現序列標幟	103
表現蛋白	1
阿里山山櫻	233
品質	317
柑橘	63
柑橘潰瘍病	265
柑橘潰瘍病菌	265
籽粒重	85
耐鹽性	193
苯丙氨酸解氨酶	205
重複性序列聚合酵素連鎖反應	265
徒手摘取	205
時序培養	305
柴胡	119
消費偏好	256
浸水	95
秧苗期	193
荔枝	143
荔枝害蟲	133
荔枝細蛾	143
草藥	183
馬鈴薯	95
高壓液相層析	119
胺基酸組成及屬性	161
區域防治	63
區域試驗	279
基因表現量統計	103
基因選殖	215
基因轉殖作物	95, 175
產量比較試驗	279
細胞培養	119
蛋白質結構	161
逢機增殖多型性 DNA	233
植酸酵素基因	95, 175

殘株管理 95
氮源 305
集群分析 161
椪柑 256
農產品批發市場 74
農藝性狀 175
過氧化酶 205
對應分析 161
種子發芽 295
聚丙烯醯胺膠體電泳 265
遠端監控 15
銀耳 243
銅皮石斛 295
鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1 1
蔗糖 305
遺傳分析 153
遺傳多樣性 233
鞘蛋白基因 1
轉基因木瓜 49
藥用植物 119
關係承諾 74
關係品質 74
類胡蘿蔔素 215
鐮刀割取 205

JOURNAL
OF
TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Keywords Index

Acute oral toxicity test 183
Acute oral toxicity 243
Agronomic traits 175
Ames test 243
Anoectochilus formosanus Hayata 183
Anthocyanin 33, 279
Anthurium 15
Anti-oxidative activity 33
Area-wide control 63
Automated fertigation 15
Automated system 103
Bactrocera dorsalis 63, 143
Bupleuri Radix 119
Carbohydrate source 305
Carotenoids 215
Cell culture 119
Citrus canker 265
Citrus 63
Cluster analysis 161
Composition and attribution of amino acids 161
Conopomorpha sinensis 143
Consumers' preferences 256
Correspondence analysis 161
CP gene 1
Damage 143
Danshen 305
Dendrobium moniliforme 295
Expressed protein 1
Expressed sequence tag 103
Farm wholesaler market 74
Flooding 95
Fruit bagging 133
Functional annotation and classification 103
Functional markers 317
Gene cloning 215
Gene effect 153
Gene expression 215
Gene representation statistics 103
Genetic diversity 233
Genetically modified crops 95, 175
Grain quality 317
Hairy root culture 305
Hand-harvesting 205
High performance liquid chromatography 119
In vitro seed germination 295
Internal browning 205
Justice 74
Kernel weight 85
Litchi pests 133
Litchi 143
Logit model 256
Maize 85, 153
Mangifera indica 215
Mango 215
Mass propagation 295
Medicinal herb 183
Medicinal plant 119
Mutant lines 193
Nitrogen source 305
Oryza sativa 317
Papaya ring spot virus (PRSV) 49
Pericarp content 85
Pericarp thickness 85, 153
Perl script 103
Peroxidase 205
Phenylalanine ammonia lyase 205
Phytase gene 95, 175
Phytoene desaturase 215
Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 1
Polyphenol oxidase 205
Polysaccharides 243
Ponkan 256

Potato 95
Protein structure 161
Prunus transarisanensis 233
pthA gene 265
Purple flesh 279
RAPD 233
Rat 183
Real time 15
Regional trial 279
Relationship commitment 74
Relationship quality 74
Remote monitoring control system 15
Rep-PCR 265
Residue management 95
Rice (*Oryza sativa* L.) 103, 161, 175, 193, 317
Risk assessment 183
Salmonella typhimurium 243
Salt tolerance 193
Salvia miltiorrhiza 305
SDS-PAGE 265
Secondary metabolite 119, 305
Seedling stage 193
Sequence comparison 1
Sickle-harvesting 205
Small acreage model 63
Soil available nutrients 49
Soil microbial populations 49
Solanum tuberosum 95
Sweet potato 33
Tainan-white 153
Tanshinones 305
Time-course study 305
Total phenolic 33
Transgenic papaya 49
Tremella fuciformis 243
Xa genes 161
Xanthomonas axonopodis pv. *Citri* 265
Xenia effects 85
Yield trial 279
Yuh-heh-bau litchi 133

台 灣 農 業 研 究 稿 約

一、本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性季刊，刊登農業試驗研究相關之研究稿件：

論　　說：由本所邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，圖與表附於其後，全文以不超過 10 印刷頁為原則。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫，但須附中英文摘要，全文以不超過 4 印刷頁為原則。

二、稿件應以中文或英文撰寫。來稿請送原稿及電子檔案各一份 (內各附照片原圖，繪製圖版可附原圖與影印圖片二份)。文稿以 A4 大小之白色紙張 (長 29.6 公分，寬 21 公分) 兩倍行高 (double space) 打字，12 號字體，左邊對齊，版面應上下預留 3 公分，左右 2 公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以 Times New Roman 字體打字；英文字距一格，句距二格。審查接受之稿件，隨文請附紙本文稿一份與電子檔案，以利送審及電腦排版等作業。

三、稿件格式：

題　　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (簡題 12 字以內)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。題目附小註，說明研究報告編號。

作　　者：作者姓名置中，中文名字間空一格；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以“，”相隔，最後一人前加“and”字樣，其表示方法如 Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位，通訊作者須附電子郵件信箱與傳真機號碼。題目與作者同置第一頁。

摘　　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字為原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附稿件編號、作者、通訊作者之小註。

本　　文：依序為前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSION)、誌謝 (ACKNOWLEDGEMENTS)、引用文獻 (LITERATURE CITED)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分章節，每一章節內並可再分小章節，以助明瞭文稿內容。章節題目 (heading) 單行置於該章節之前，小章節題目 (subheading) 直接置於小章節之首。

表　　格：

1、每一表格應分別繕製，須以 word 中“表格”工具製作，上方須有標題，並按文中出現順序加上**表 1. (Table 1.)**，**表 2. (Table 2.)** 等冠號。

2、中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。

3、表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照。

4、表中內容如需說明，均須附加小註，以 z, y, x,…等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。

5、性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1、手繪圖版以黑色墨水分別繪圖紙或描繪紙（白色透明紙）上。如以電腦繪圖，請以鐳射印表機或同規格之印表機列印，力求清晰。

2、圖中加註者，應於圖中說明，或以括號註明於標題之後。

3、照片以光面紙爲原則，清晰度以縮小 50%可判讀爲宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面 (25 cm × 18 cm) 爲宜。

4、圖版及照片下方應有標題（或另頁繕寫），並按文中出現的順序加上**圖 1 (Fig. 1)**、**圖 2 (Fig. 2)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿應中英文併寫，力求明確。

5、除併圖外，每一圖片應單頁製作。

6、照片、圖片背面應註上冠號及作者姓名，以免排印錯誤。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源等。誌謝可略去。

引用文獻：

1、引用文獻 (Literature cited) 一列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文爲限。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al.* 1992)，置於引用文處。

2、文獻須以英文撰寫，以姓名字母爲序。作者相同時以年代先後爲序。

3、文獻之書寫方法以期刊爲例，依序爲作者、年代、題目、期刊、卷期、頁數。

4、期刊名須用縮寫，其縮寫方式請參照 (Biosciences Information Service, 1992) 出版之 "Serial Sources for the BIOSIS Previews Database" 。

5、文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34-43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen metabolism of rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1-12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passionfruit in Taiwan. p.31-38. *in* the Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract)

四、單位、縮寫格式、括號及統計分析

1、所有度量衡均採公制，數量以阿拉伯數字，單位以英文縮寫表示；如：1 m、2 g、3 L、4 mL。各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1)長度：公里 (km)、公尺 (m)、公分 (=厘米) (cm)、公釐 (=毫米) (mm)、微米 (μm)。

(2)重量 (W)：公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、μg、公噸 (t)。

(3)容積 (V)：公升 (L)、公撮 (=毫升) (mL)、μL。

(4)面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。

2、溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。

3、時間：時 (hr, hrs)、分 (min, mins)、秒 (sec, secs)。

4、濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN) 。

5、重力加速度：*g*。

6、其他之縮寫：平均 (*av*)、大約 (*ca*)、直徑 (diam.)。

7、括號：使用半形括號 ( )，括號前後各空一格。

8、統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以 a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值 P (例如 $P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (r) 、決定係數 (R)、變異係數 (cv)、標準機差 (se) 等。

五、生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如 *Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如 *C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。

六、稿件內容務須依照上列規定格式書寫，本期刊編輯委員保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，作者得送含文稿內容之磁片或電子檔案 (IBM 相容電腦之文書管理檔，如 Word 檔或其他) ，並由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。

七、投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬農試所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。

八、來稿經編審委員會審查合格後刊登，由本刊印贈抽印本 50 本；彩色頁印刷及抽印本加印費用由投稿人自行負擔。

九、其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

台灣農業研究

（原中華農業研究）

第五十七卷　第四期

中華民國九十七年十二月出版

發行人：劉大江

總編輯：方尚仁

主　編：吳宜晏　陳盈佑

編審委員：

生技組：吳明哲（主審）

作物組：歐錫坤（主審）
呂秀英　黃肇家　楊純明　劉新裕
施昭彰　徐信次　劉政道

農化組：郭鴻裕（主審）
簡宣裕　劉滄棽

植病組：安寶貞（主審）
蔡武雄　鄧汀欽　謝廷芳

應動組：王清玲（主審）
陳健忠　鄭　允　溫宏治

農工組：蔡致榮（主審）
黃禮棟　梁連勝

種原組：黃勝忠（主審）

農經組：潘德芳（主審）

另聘請各大學院校及研究機關相關學者專家擔任審查委員

Vol. 57, No. 4 Dec, 2008

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

PUBLISHER: Liu, Dah-Jiang

EDITOR IN CHIEF: Fang, Shan-Jen

EDITORS:

Wu, Yi-Yan Chen, Ying-You

EDITORIAL BOARD:

Ann, Pao-Jen (Plant Pathology)
Guo, Horng-Yuh (Agriculture Chemistry)
Huang, Sheng-Chung (Crop Genetic Resources)
Ou, Shyi-Kuan (Crop Science)
Pan, Te-Fang (Agriculture Economics)
Tsay, Jyh-Rong (Agriculture Engineering)
Wang, Chin-Ling (Applied Zoology)
Wu, Min-Tze (Biotechnology)

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

Chen, Chien-Chung
Cheng, Edward Yun
Chien, Shiuah-Yuh
Deng, Ting-Chin
Hsieh, Ting-Feng
Hsu, Hsin-Tszu
Huang, Chao-Chia
Huang, Li-Duhng
Liang, Lien-Sheng
Liou, Tsung-Dao
Liu, Sin-Yie
Liu, Tsang-Sen
Lu, Hsiu-Ying
Shih, Jau-Chang
Tsai, Wu-Hsiung
Wen, Hung-Chich
Yang, Chwen-Ming

Reviewers of the related fields are also invited from universities and other research organizations.

誌謝

本學術期刊刊載農業研究成果報告，無論篇幅與內容上，均有明顯之成長與進步，深受國內外農業界支持。謹此，對今年參與本刊稿件評審工作的諸位評審委員（如下列；依姓名筆劃順序），表示誠摯之謝意與感激！

王強生	王慶裕	古明萱
石正人	何政坤	吳明哲
呂水淵	周微茂	林文川
林正宏	林長平	林信山
林順福	邱義源	胡澤寬
唐立正	張清安	曹幸之
盛中德	郭寶錚	陳良築
陳宗禮	陳政位	陳健忠
陳凱儀	陳煜焜	陳福安
陳福旗	陳駿季	曾經洲
黃文琪	黃肇家	黃鴻章
黃鵬林	楊秋忠	楊雯如
楊耀祥	萬鐘汶	葉茂生
詹富智	鄔宏潘	劉瑞芬
鄭育斌	盧福明	賴博永
顏國欽	羅朝村	

台灣農業研究第五十七卷第四期

出 版 者：行政院農業委員會農業試驗所

發 行 人：劉大江

總 編 輯：方尚仁

地　　址：413台中縣霧峰鄉萬豐村中正路189號

網　　址：http://www.tari.gov.tw

電　　話：(04)23302301

出版日期：中華民國九十七年十二月三十一日

定　　價：新臺幣一七五元

展 售 處：五南文化廣場　400台中市中山路6號　(04)22260330

國家書店松江門市　104台北市松江路209號1樓　(02)25180207

國家網路書店　http://www.govbooks.com.tw

承 印 者：學安文化事業有限公司

電　　話：(04)22861600

ISSN 0022-4847

GPN 2009500560

Dec, 2008

Journal of Taiwan Agricultural Research

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Vol. 57, No. 4

Research Reports

Study on the Genetic Diversity of *Prunus transarisanensis* Hayata
Ien-Chie Wen, Ching-Yi Chang, and Chien-Yuan Kao 233

Evaluation for Toxicology and Mutagenicity of *Tremella* Polysaccharide Extracted from *Tremella fuciformis*, Berk
Shu-Hui Yang, Kun-Chao Chen, Jhaol-Huei Wu, and Jiunn-Wang Liao 243

A Study on Germany Consumers' Preferences for Taiwan Ponkan
Hsiu-E Chiang, Shi-Hua Yang, and Te-Fang Pan 256

Characterization of Novel Strains of Citrus Canker Bacterium from Citrus in Taiwan
Hsin-Cheng Lin, Hsiang Chang, and Kuo-Ching Tzeng 265

Breeding of the New Sweet Potato Variety, Tainung No. 73
Yung-Chang Lai, Zhong-Tian Li, Toong-Long Jeng, and Wu-Hsiung Tsai 279

In Vitro Seed Germination and Mass Propagation of *Dendrobium moniliforme*, a Native Species in Taiwan
Shu-Fang Lo, Chao-Lin Kuo, Chung-Li Chen, and Hsin-Sheng Tsay 295

Production of Tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in Hairy Root Culture
Uei-Chern Chen, Hsiao-Sung Chan, Choi-Yi Lee, Chin-Yi Tsao, Jen-Chyi Liu, Yahn-Chir Lee, and Chi-Ni Hsia 305

Research Notes

Genetic Analysis of Rice Grain Quality Traits Using Functional Markers
Jen-Ren Chen, Charng-Pei Li, Tung-Hai Tseng, and Min-Tze Wu 317

ISSN 0022-4847

Published by The Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture Taichung, Taiwan, Republic of China

行政院新聞局出版事業登記證局版臺省誌字第二九八號　中華郵政中臺字第〇三〇九登記為雜誌交寄

GPN 2009500560
定價：新台幣一七五元